

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de nutrición y Bromatología III
(Higiene y Tecnología de los Alimentos)**



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS E
INMUNOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
ESPECIES DE ALMEJAS DE INTERÉS
COMERCIAL EN ESPAÑA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia María Fernández de Mingo

Bajo la dirección de las doctoras
M^a del Rosario Martín de Santos
Teresa García Lacarra

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2156-7

T 25551

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III
(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)



BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314039216

**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS E INMUNOLÓGICAS PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ALMEJAS DE INTERÉS COMERCIAL
EN ESPAÑA**

Memoria que para optar al grado de
Doctor presenta la Licenciada en
Veterinaria Alicia M^a Fernández de Mingo

Madrid, noviembre de 2001



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III
HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

M^a DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (*Catedrática de Nutrición y Bromatología*) y **TERESA GARCÍA LACARRA** (*Profesora Titular de Nutrición y Bromatología*),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Utilización de técnicas genéticas e inmunológicas para la identificación de especies de almejas de interés comercial en España”**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Alicia M^a Fernández de Mingo, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección conjunta, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Madrid, noviembre de 2001

Fdo.: M^a del Rosario Martín de Santos

Fdo.: Teresa García Lacarra

"Cuando una persona desea realmente algo, el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño. Basta con aprender a escuchar los dictados del corazón y a descifrar un lenguaje que está más allá de las palabras, el que muestra aquello que los ojos no pueden ver".

PAOLO COELHO, *El Alquimista*.

"No hay que tener miedo a lo desconocido, simplemente hay que entenderlo".

MARIE CURIE.

A mis padres Francisco y Alicia

A mi hermana M^a Angeles

A mis hermanos Enrique y Francisco Javier

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas y entidades que han colaborado directa o indirectamente en la realización de esta Tesis Doctoral, en particular:

Al profesor Dr. Lorenzo de la Hoz Perales, director del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria de Madrid, por brindarme la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en este Departamento.

Expreso mi gratitud a la Prof. Dra. M^a del Rosario Martín de Santos, por su dedicación, apoyo constante e interés en mi formación a lo largo de todo el período de realización de este trabajo. Muy especialmente a la Prof. Dra. Teresa García Lacarra, por su paciencia y dedicación durante mis primeros pasos en la investigación y por todas las enseñanzas recibidas. Al Prof. Dr. Pablo E. Hernández Cruza, por su apoyo y trato amable.

A todos y cada uno de los Profesores de este Departamento, por su amabilidad y desinteresada ayuda siempre que lo he necesitado; en especial a Isabel González, Juan Miguel Rodríguez (Soria...), María Marín y Luis Cintas, por ser tan cariñosos conmigo y por ayudarme amablemente cuando lo he necesitado. A Alberto y Aurora, por vuestra ayuda amable para la realización de esta tesis.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de una beca dentro del Plan de Formación de Profesorado y de Personal Investigador.

A todos los doctores y doctorandos de este Departamento, que con vuestra amistad, compañerismo y ayuda habéis contribuido a hacer más agradables las jornadas de trabajo en el laboratorio. Especialmente a mis compañeros de laboratorio Luis Asensio, por ser tan dulce y comprensivo, por tu ayuda y compañerismo constantes, y Miguel Ángel Rodríguez, por apoyarme en todo momento y por hacerme reír para comprender que todo se puede ver desde otro punto de vista. También quiero dar las gracias a mis compañeras las Dras. Esther Carrera y Ana Céspedes por vuestra dedicación en mis primeros pasos en el laboratorio. A Roberto Valcarce y David Vega, por vuestra ayuda desinteresada en el laboratorio.

A la Dra. Carmen Herranz, gracias a esta tesis he tenido la suerte de conocerla, por ser mi amiga y estar conmigo en los buenos y malos momentos. A los Dres. Adrián Martínez, por tu amistad e ironía sin igual, y José María Martínez, por tu permanente ayuda y disponibilidad y por

hacernos reír para hacer más grato el trabajo de laboratorio. A Maribela, Isabel Berruga, Begoña Ruiz, Antonio, Beatriz, Matilde, Carlos, Juliana, Adriana, Rocío, Rosanna, Ana del Olmo, Raquel, Jorge, Carlota.... y en general, a todos los doctorandos del Departamento por vuestro compañerismo y amistad.

Quisiera agradecer a los miembros del Department of Marine and Biology Sciences (University of South Carolina) la estancia tan increíble y maravillosa vivida allí. En especial, dar las gracias al Prof. Dr. Thomas J. Hilbish, por aceptarme en su grupo y ayudarme a integrarme en la vida americana. A Matt y Lisa Gilg, Kimberly, Lisa Davis y Manuel, Chris, Michelle, Jeny, Lanie, Rebecca... y a tantas personas estupendas que hicieron de mi estancia una experiencia inolvidable, siempre seré "our little spanish girl".

A todos mis amigos que siempre han estado apoyándome y haciendo "gracias" con el tema de mi tesis, especialmente a Guadalupe, Ana y Pedro, Ana Manso, Maribel, Miriam, Rosa y Carlos, Begoña, Ana Lladró, Paolo, Jesús (Béjar...), Juan Carlos y Mery.

A toda mi familia por apoyarme y animarme en todo momento, y en especial a mis padres Francisco y Alicia, por vuestra enseñanza, cariño y apoyo en todo lo que hacemos. A mi hermana M^a Angeles, por soportarme, animarme y compartir conmigo todos los momentos, incluso los fines de semana que tenía trabajo en el laboratorio. A mi hermano Enrique por su apoyo constante, y a mi hermano Francisco Javier, por tu ayuda "logística" inestimable para la realización de esta tesis y sobre todo, por hacerme reír que ya sabes tanto me gusta.

ÍNDICE

	Página
I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	2
II. INTRODUCCIÓN	9
II.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y MORFOLÓGICA DE LAS ALMEJAS DE INTERÉS COMERCIAL EN ESPAÑA	10
II.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL MERCADO DE ALMEJAS EN ESPAÑA	19
II.2.1. Capturas y acuicultura	19
II.2.2. Comercio exterior de almejas	31
II.2.3. Consumo y comercialización de almejas en España	32
II.3. INFORMACIÓN AL CONSUMIDOR: ASPECTOS LEGALES	37
II.4. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO Y MARISCO	40
II.4.1. Técnicas basadas en el análisis de proteínas	41
II. 4.1.1. Técnicas electroforéticas	42
II.4.1.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato-sódico (SDS-PAGE)	45
II.4.1.1.2. Isoelectroenfoque (IEF)	48
II.4.1.1.3. Electroforesis capilar (EC)	55
II.4.1.2. Técnicas cromatográficas	56
II.4.1.3. Técnicas inmunológicas	59
II.4.1.3.1. Inmunodifusión en geles de agar	59
II.4.1.3.2. Inmunoelectroforesis	61
II.4.1.3.3. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)	62
II.4.2. Técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos	69
II.4.2.1. Estudios de hibridación	76
II.4.2.2. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	79
II.4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa	81

II.4.2.3.1. Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR	86
II.4.2.3.2. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP)	89
II.4.2.3.3. Análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP)	92
II.4.2.3.4. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)	96
II.4.2.3.5. Estudio de secuencias repetitivas del ADN cromosómico	100
II.4.2.3.5.1. Satélites	101
II.4.2.3.5.2. Minisatélites y Microsatélites	101
III. MATERIAL Y MÉTODOS	108
III. 1. MATERIAL	109
III.1.1. Material biológico	109
III.1.1.1. Muestras de almejas	109
III.1.1.2. Animales de experimentación	109
III.1.2. Material de laboratorio	110
III.1.3. Productos y reactivos	112
III.2. MÉTODOS EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS GENÉTICAS	113
III.2.1. Selección de marcadores genéticos	113
III.2.2. Diseño de cebadores	115
III.2.2.1. Gen nuclear α -actina	115
III.2.2.1.1. Cebadores act-2 y act-4	115
III.2.2.1.2. Cebadores act-5 y act-6	116
III.2.2.2. Espaciador interno de la transcripción (ITS)	116
III.2.2.3. Gen mitocondrial 16S ARNr	117

III.2.2.4. Gen arginina quinasa	118
III.2.2.4.1. Cebadores AK _{rna} y AK _{om}	118
III.2.2.4.2. Cebadores oligo-dT-adaptor y AK _{alm}	118
III.2.3. Extracción de ácidos nucleicos	119
III.2.3.1. Extracción del ADN	119
III.2.3.1.1. Método de extracción de DeSalle y col. (1993)	120
III.2.3.1.2. Método de extracción de Borgo y col. (1996)	120
III.2.3.1.3. Método de extracción de Jones y col. (1993)	121
III.2.3.1.4. Método de extracción de Patwary y col. (1996) ...	122
III.2.3.1.5. Método de extracción de Bagshaw (1991)	123
III.2.3.1.6. Método de extracción QIAamp Tissue Kit	124
III.2.3.1.7. Método de extracción Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food	126
III.2.3.2. Extracción del ARN	128
III.2.3.2.1. Método de extracción Ultraspec™ RNA Isolation System (BIOTECX)	128
III.2.3.2.2. Método de extracción con RNeasy Mini Kit (QIAGEN)	130
III.2.4. Determinación de la calidad y concentración de los ácidos nucleicos ...	131
III.2.4.1. Integridad del ADN y ARN	131
III.2.4.2. Pureza del ADN y ARN	132
III.2.4.3. Concentración del ADN y ARN	132
III.2.5. Obtención del ARN mensajero (ARNm) y ADN complementario (ADNc)	133
III.2.5.1. Obtención del ARNm	133
III.2.5.2. Síntesis del ADNc	134

III.2.5.2.1. Síntesis del ADNc con transcriptasa inversa aviar (AMV-RT)	135
III.2.5.2.2. Obtención del ADNc con transcriptasa inversa de ratón (M-MLV RT)	136
III.2.6. Amplificación de los fragmentos seleccionados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	136
III.2.6.1. Gen nuclear α -actina	138
III.2.6.1.1. Cebadores act-2 y act-4	138
III.2.6.1.2. Cebadores act-5 y act-6	138
III.2.6.2. Espaciador interno de la transcripción (ITS)	139
III.2.6.3. Gen mitocondrial 16S ARNr	139
III.2.6.4. Gen arginina quinasa	140
III.2.6.4.1. Cebadores AKrna y AKom	140
III.2.6.4.2. Cebadores AKalm y oligo-dT-adaptor	140
III.2.7. Análisis electroforético de los productos de PCR	141
III.2.8. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR	143
III.2.8.1. Purificación de los productos de PCR	143
III.2.8.2. Clonación de los productos de PCR	146
III.2.8.2.1. Ligación de los productos de PCR	147
III.2.8.2.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> ...	149
III.2.8.3. Secuenciación de los productos de PCR purificados	152
III.2.9. Análisis informático de las secuencias de ADN	153
III.2.10. Técnica de PCR-RFLP	154
III.2.10.1. Gen nuclear α -actina	155
III.2.10.2. Espaciador interno de la transcripción (ITS)	156
III.2.10.3. Gen mitocondrial 16S ARNr	156
III.2.11. Técnica de PCR-SSCP	157

III.2.11.1. Desnaturalización de los productos de PCR	157
III.2.11.2. Electroforesis de las muestras	157
III.3. MÉTODOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	159
III.3.1. Preparación de los extractos antigénicos	159
III.3.1.1. Extracción de las proteínas solubles	161
III.3.1.2. Determinación de la concentración proteica	161
III.3.2. Producción de anticuerpos policlonales	164
III.3.2.1. Pauta de inmunización	164
III.3.2.2. Sangría final	166
III.3.2.3. Obtención y conservación del suero	166
III.3.2.4. Purificación parcial de los anticuerpos	168
III.3.2.5. Neutralización de los anticuerpos mediante la técnica de inmunoadsorción	169
III.3.3. Técnica de ELISA indirecto en placa	169
III.3.4. Técnica de ELISA indirecto en paletas	172
III.3.5. Obtención de anticuerpos monoclonales	175
III.3.5.1. Pauta de inmunización	175
III.3.5.2. Fusión celular	177
III.3.5.3. Selección de los hibridomas	179
III.3.5.4. Evaluación de los hibridomas	181
III.3.5.5. Clonación de los hibridomas	183
III.3.5.6. Expansión y congelación de los hibridomas	184
IV. RESULTADOS	185
IV.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA (<i>V. pullastra</i>), FINA (<i>R. decussatus</i>), ITALIANA (<i>R. philippinarum</i>) Y RUBIA (<i>V. rhomboides</i>) MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS	186
IV.1.1. Diseño de cebadores	186
IV.1.1.1. Gen α -actina	186

IV.1.1.2. Espaciador interno de la transcripción (ITS)	187
IV.1.1.3. Gen 16S ARNr	187
IV.1.1.4. Gen arginina quinasa	187
IV.1.2. Extracción del ADN	188
IV.1.3. Extracción del ARN	194
IV.1.4. Utilización de los marcadores genéticos seleccionados para la identificación de especies de almejas	196
IV.1.4.1. Gen α -actina	196
IV.1.4.1.1. Amplificación por PCR y secuenciación	196
IV.1.4.1.2. Selección de endonucleasas y análisis de restricción	200
IV.1.4.1.3. Análisis del polimorfismo en la longitud de las cadenas sencillas de ADN (PCR-SSCP)	210
IV.1.4.2. Espaciador interno de la transcripción (ITS)	213
IV.1.4.2.1. Amplificación por PCR y secuenciación	213
IV.1.4.2.2. Selección de endonucleasas y análisis de restricción	218
IV.1.4.3. Gen mitocondrial 16S ARNr	237
IV.1.4.3.1. Amplificación por PCR y secuenciación	237
IV.1.4.3.2. Selección de endonucleasas y análisis de restricción	239
IV.1.4.4. Gen arginina quinasa	252
IV.1.4.4.1. Amplificación por PCR y secuenciación	252
IV.1.4.4.2. Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de la enzima arginina quinasa para el estudio de fragmentos peptídicos específicos de las especies de almejas	258
IV.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA (<i>V. pullastra</i>), FINA (<i>R. decussatus</i>), ITALIANA (<i>R. philippinarum</i>) Y RUBIA (<i>V. rhomboides</i>) MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	260

IV.2.1. Preparación de los extractos antigénicos	261
IV.2.2. Obtención de anticuerpos policlonales frente a las proteínas solubles de almeja babosa (<i>V. pullastra</i>), fina (<i>R. decussatus</i>), italiana (<i>R. philippinarum</i>) y rubia (<i>V. rhomboides</i>)	262
IV.2.2.1. Valoración de la especificidad de los anticuerpos policlonales y desarrollo de una técnica de ELISA indirecto en placa para identificar especies de almejas	263
IV.2.2.2. Técnica de ELISA indirecto en paletas para identificar especies de almejas	266
IV.2.3. Obtención de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas solubles de almeja fina (<i>R. decussatus</i>)	267
V. DISCUSIÓN	269
V.1. IDENTIFICACIÓN DE ALMEJA BABOSA (<i>V. pullastra</i>), FINA (<i>R. decussatus</i>), ITALIANA (<i>R. philippinarum</i>) Y RUBIA (<i>V. rhomboides</i>) MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS	270
V.1.1. Extracción de ácidos nucleicos	272
V.1.1.1. Extracción del ADN	272
V.1.1.2. Extracción del ARN	278
V.1.2. Selección de los marcadores genéticos	279
V.1.3. Diseño de los cebadores	281
V.1.4. Amplificación por PCR	285
V.1.5. Secuenciación y análisis de restricción de los productos de PCR	287
V.1.6. Diferenciación de las especies de almejas babosa, fina, italiana, y rubia mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen α -actina	290
V.1.7. Diferenciación de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia mediante PCR-SSCP de un fragmento del gen α -actina	295
V.1.8. Diferenciación de las especies de almejas babosa, fina e italiana mediante PCR-RFLP de un fragmento del espaciador interno de la transcripción (ITS)	298

V.1.9. Diferenciación de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen mitocondrial 16S ARNr	302
V.1.10. Análisis mediante RT-PCR de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del extremo 3' del gen que codifica la arginina quinasa en las especies de almejas	304
V.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA (<i>V. pullastra</i>), FINA (<i>R. decussatus</i>), ITALIANA (<i>R. philippinarum</i>) Y RUBIA (<i>V. rhomboides</i>) MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	309
V.2.1. Obtención de anticuerpos policlonales	310
V.2.1.1. Valoración de la especificidad de los anticuerpos y técnica de ELISA indirecto en placa	313
V.2.1.2. Técnica de ELISA indirecto en paletas	318
V.2.2. Obtención de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina (<i>R. decussatus</i>)	320
VI. CONCLUSIONES	327
VII. TRABAJO FUTURO	330
VIII. BIBLIOGRAFÍA	334
IX. ÍNDICE DE FIGURAS	386
X. ÍNDICE DE TABLAS	393
XI. GLOSARIO DE TÉRMINOS	396

Capítulo I

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

La riqueza biológica de los casi 6.000 Km que integran el litoral español, constituye desde la antigüedad una fuente de recursos esenciales para las poblaciones ribereñas que, mediante la pesca, el marisqueo y la acuicultura, la aprovechan como alimento y fuente de ingresos. Esta tradición ha llevado a nuestro país a situarse entre los primeros del mundo, tanto en la producción como en el consumo de pescados y mariscos. Sin embargo, los consumidores tienden a concentrar la demanda en un reducido número de especies, muchas de las cuales alcanzan un elevado precio en el mercado. La gran diferencia de precios existente entre especies afines favorece la sustitución de aquéllas de mayor valor comercial por las menos valoradas. Este hecho, además de constituir un fraude, tiende a perpetuar la desinformación de los consumidores y la marginación en el mercado de un gran número de especies, en ocasiones con un excelente valor nutritivo y culinario (Penedo y col., 1992; Sotelo y col., 1993).

Entre los moluscos bivalvos de consumo habitual en España, las almejas ocupan un lugar destacado. Las principales especies de almejas que se comercializan en nuestro país son la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), la italiana o japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y la rubia (*Venerupis rhomboides*). Según la especie de que se trate presentan una serie de características morfológicas que permiten identificarlas, como el color, forma y estriaciones de la concha, así como la longitud, separación y color de los sifones que le sirven para filtrar el agua de la que obtienen su alimento. Entre las especies citadas, la almeja fina es la más apreciada por los consumidores, debido a su exquisito sabor y textura, siendo también la especie que alcanza un mayor valor comercial. Uno de los múltiples parámetros que determina la calidad de un producto es su autenticidad. El consumidor espera que el producto que adquiere se comercialice bajo la denominación a la que realmente corresponde. Asimismo, la Administración debe controlar la autenticidad de los productos que se venden bajo una determinada denominación.

Cuando las almejas se adquieren vivas, las personas entrenadas pueden diferenciarlas por sus características morfológicas. Sin embargo, también pueden comercializarse sin concha como productos frescos, congelados, enlatados o formando parte de platos preparados. En estos casos, los criterios habituales de identificación resultan insuficientes para establecer la identidad biológica de las especies comercializadas, o para demostrar su presencia en productos que las contienen. Por ello es necesario disponer de técnicas rápidas que permitan comprobar la autenticidad de una materia prima o de un producto elaborado, con el fin de garantizar el cumplimiento de las normas de etiquetado y una correcta información al consumidor, que no es capaz de identificar morfológicamente una gran parte de las especies de productos marinos expuestas a la venta.

Las técnicas utilizadas en identificación de especies cuando no se dispone de base anatómica se pueden dividir en dos grandes grupos: aquéllas basadas en el análisis de proteínas y las que se centran en el análisis del ADN o técnicas genéticas. Los métodos basados en el análisis de proteínas que más se utilizan para la identificación de especies de pescados y mariscos incluyen distintas técnicas electroforéticas, como el isoelectroenfoque (Secchi y col., 1982; Hsieh y col., 1997; Etienne y col., 2000; Piñeiro y col., 2000), la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (Hu y col., 1992; Kitts y col., 1997; Etienne y col., 2000), o la electroforesis capilar (Gallardo y col., 1995; Chou y col., 1998), técnicas cromatográficas de RP-HPLC (Piñeiro y col., 1997; Ross y col., 1998), y técnicas inmunológicas (Verrez-Bagnis y Escruche-Roberto, 1993, Carrera y col., 1997; Céspedes y col., 1999c). Por otro lado, las técnicas genéticas empleadas en la identificación de especies de productos marinos se basan, en su mayoría, en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y en la posterior utilización de técnicas complementarias como la secuenciación (PCR-Secuenciación) (Geller y col., 1993; Rumbak y col., 1994; Canapa y col., 2000), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Kenchington y col., 1993; Rawson y col., 1995; Carrera y col., 1999b, 1999c; Cocolin y col., 2000), el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de

ADN (PCR-SSCP) (Céspedes y col., 1999b; Martínez y Daniëlsdottir, 2000), o el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) (Patwary y col., 1994; Harding y col., 1997, Meruane y col., 1997).

Las técnicas electroforéticas y cromatográficas generan perfiles proteicos complejos y bastante similares para las distintas especies, lo que dificulta su correcta identificación (Meyer y Candrian, 1996). Por el contrario, los resultados obtenidos con las técnicas inmunológicas, basadas en la visualización objetiva de la interacción entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, y las técnicas genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN, son sencillos de interpretar. Además, son técnicas muy sensibles y específicas, y permiten llevar a cabo el análisis rutinario de un gran número de muestras (Bossier, 1999; Sweijd y col., 2000).

En la industria alimentaria, las técnicas de PCR se han aplicado en control de calidad, para la detección rápida de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Hill, 1996; Gutierréz y col., 1998; Scheu y col., 1999), así como para la identificación de diferentes componentes de los alimentos (Rehbein y col., 1995b; Carrera y col., 1999a; Céspedes y col., 1999a). La base de estas aplicaciones se cimenta en la amplificación y detección de fragmentos de ADN con alta tasa de variabilidad interespecífica pero escasa variación entre individuos de la misma especie, lo que permite determinar con exactitud la o las especies utilizadas en la elaboración de un producto alimentario. Estos métodos genéticos de identificación de especies, a pesar de ser más caros y exigir un mayor soporte técnico que los métodos de análisis de proteínas, presentan importantes ventajas frente a éstos, entre las que cabe destacar (Ferguson y col., 1995; Meyer y Candrian, 1996):

- La pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis.
- El mayor grado de variabilidad genética examinado.
- La posibilidad de analizar muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización.

Actualmente los esfuerzos en el desarrollo de técnicas rápidas y de fácil aplicación se dirigen también a la obtención de proteínas específicas frente a

las que se puedan producir anticuerpos para su utilización en ensayos inmunológicos, como las técnicas de ELISA. A pesar de que las técnicas de ELISA se han empleado en la identificación de especies de animales de abasto y productos cárnicos (Hernández y col., 1994; Chen y col., 1998), o en leche y productos lácteos (García y col., 1991; Anguita y col., 1995), su utilización en la identificación de especies de pescado y marisco ha sido menor (Taylor y Jones, 1992b; Shepard y Hartmann, 1996; Céspedes y col., 1999c). Esto puede ser consecuencia de que la obtención de anticuerpos específicos, en el caso de los productos marinos, es más compleja debido a la gran variedad de especies comercializadas y a las estrechas relaciones filogenéticas existentes entre ellas (Bossier, 1999). No obstante, las técnicas inmunológicas son más baratas y requieren un menor equipamiento que las técnicas genéticas. Por lo tanto, la puesta a punto de inmunoensayos constituye una interesante alternativa para la identificación de especies de pescados y mariscos, principalmente cuando su desarrollo está encaminado a la producción de *kits* comerciales que facilitan la identificación de las especies a nivel de campo (Sweijd y col., 2000).

Por todo ello, este trabajo plantea el desarrollo y puesta a punto de técnicas genéticas e inmunológicas para la identificación de las especies de almejas de mayor interés comercial en España: almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*). Los objetivos que se pretenden alcanzar son los siguientes:

- 1) Selección de marcadores genéticos y utilización de técnicas de PCR-RFLP, y PCR-SSCP, para obtener perfiles característicos que permitan la diferenciación de las cuatro especies de almejas objeto de estudio. Para ello será necesario:
 - Identificar y seleccionar marcadores genéticos (nucleares y mitocondriales), que permitan la amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
 - Poner a punto un método de extracción de ADN a partir de las muestras de almejas objeto de análisis.
 - Amplificar por PCR los fragmentos génicos seleccionados.

- Secuenciar los productos de PCR obtenidos tras la amplificación, con el fin de encontrar diferencias en sus secuencias nucleotídicas que permitan la selección de endonucleasas con las que obtener patrones característicos para cada especie (PCR-RFLP).
 - Desnaturalizar los productos de PCR y analizarlos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, con el fin de obtener perfiles de bandas de ADN específicos para cada especie (PCR-SSCP).
 - Comprobar la ausencia de polimorfismo intraespecífico en los perfiles obtenidos mediante PCR-RFLP y PCR-SSCP.
- 2) Selección de un marcador genético y utilización de la técnica de RT-PCR, para estudiar las secuencias aminoacídicas derivadas del ARN mensajero en las almejas babosa, fina, italiana y rubia. Este estudio tendrá la finalidad de identificar fragmentos peptídicos específicos de cada especie de almeja. Para ello será necesario:
- Identificar y seleccionar un marcador genético que codifique una proteína en la que se puedan encontrar fragmentos de secuencia aminoacídica específica para cada especie de almeja.
 - Poner a punto un método de extracción de ARN a partir de las muestras de almejas.
 - Obtener ARN mensajero (ARNm) a partir del ARN obtenido en las cuatro especies de almejas.
 - Sintetizar ADNc a partir del ARNm, y amplificar mediante PCR el fragmento génico seleccionado.
 - Secuenciar los productos de PCR obtenidos tras la amplificación, con el fin de estudiar sus secuencias nucleotídicas.
 - Analizar las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc en busca de regiones específicas de cada especie de almeja. Las regiones específicas servirían para diseñar péptidos sintéticos con los que inmunizar animales de experimentación para obtener anticuerpos especie-específicos, y

desarrollar y poner a punto técnicas de ELISA que permitan diferenciar las cuatro especies de almejas.

3) Obtención de anticuerpos policlonales frente a las proteínas solubles de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, y desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que permitan diferenciar dichas especies. Para ello será necesario:

- Inmunizar lotes de conejos con las proteínas solubles de las especies de almejas de interés.
- Comprobar, mediante técnicas de ELISA, si los inmunoseros obtenidos reconocen a proteínas solubles de especies de almejas distintas de aquéllas frente a las que se obtuvieron.
- Obtener anticuerpos especie-específicos a partir de los inmunoseros obtenidos en la fase anterior. Para ello se utilizarán técnicas de inmunoadsorción con proteínas solubles de las especies heterólogas.
- Utilizar los anticuerpos especie-específicos para desarrollar y poner a punto técnicas de ELISA que permitan diferenciar las especies de almejas objeto de análisis.

4) Obtención de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas solubles de la almeja fina, y desarrollo de técnicas inmunológicas que permitan la identificación específica de dicha especie. Para ello será necesario:

- Inmunizar ratones Balb/c con los extractos proteicos solubles obtenidos a partir de la almeja fina.
- Fusionar los linfocitos extraídos del bazo de los ratones inmunizados, con células de mieloma de ratón (P3×63-Ag8.653).
- Identificar, mediante técnicas de ELISA, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina.
- Determinar mediante técnicas de ELISA la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos, enfrentando los sobrenadantes de

los pocillos seleccionados con los extractos proteicos solubles de las especies heterólogas (babosa, italiana y rubia).

- Seleccionar, clonar, expandir y congelar los hibridomas productores de los anticuerpos de interés.

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

II.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y MORFOLÓGICA DE LAS ALMEJAS DE INTERÉS COMERCIAL EN ESPAÑA

La palabra molusco proviene del latín *molluscus*, que quiere decir blando. Precisamente por tener el cuerpo blando, los moluscos necesitan protegerse con una concha. Son invertebrados de simetría bilateral y constituyen un filo muy extenso del Reino animal en el que se encuadran más de 90.000 especies diferentes. Dentro del filo Moluscos se distinguen dos subtipos: Aculífera y Conchífera (*Figura 1*).

El subtipo Aculífera debe su nombre a que las células epiteliales de su manto forman una cutícula con espículas o pequeñas espinas calcáreas, y está integrado por moluscos muy primitivos. Dentro de este subtipo se incluyen tres clases: Poliplacóforos, Solenogastros y Caudofoveados. Las especies de la primera clase se defienden con placas calcáreas además de con las espinas, con las que también se defienden el resto de los aculíferos. La clase Poliplacóforos se caracteriza por tener una concha formada por ocho piezas, como el quitón verde (*Chiton olivaceus*), mientras que las especies de las otras dos clases se caracterizan por la ausencia de concha.

El subtipo Conchífera, es el más importante de los subtipos de los moluscos y se llama así porque sus especies llevan concha. Este subtipo se divide en cinco clases: Cefalópodos, Gasterópodos, Bivalvos o Lamelibranquios, Monoplacóforos y Escafópodos (Lotina, 1992). Los Cefalópodos son moluscos de cuerpo simétrico cuya concha puede ser interna, externa o bien puede faltar por completo, y además se caracterizan porque el pie, que por su parte delantera rodea a la cabeza, se divide en varios brazos o tentáculos, que pueden ser ocho como en el pulpo (*Octopus vulgaris*) o diez como en el calamar (*Loligo vulgaris*). Los Gasterópodos son los únicos moluscos que incluyen especies de vida terrestre, y por regla general su cuerpo se enrolla en espiral igual que la concha que les protege, como es el caso del bígaro (*Littorina littorea*). Por otra parte, la concha de los Escafópodos es tubiforme, curvada y abierta por los dos extremos como el diente de elefante (*Dentalium vulgaris*), mientras que los Monoplacóforos son especies fósiles cuya concha está formada por una pieza, como la especie *Neopilina galathea*.

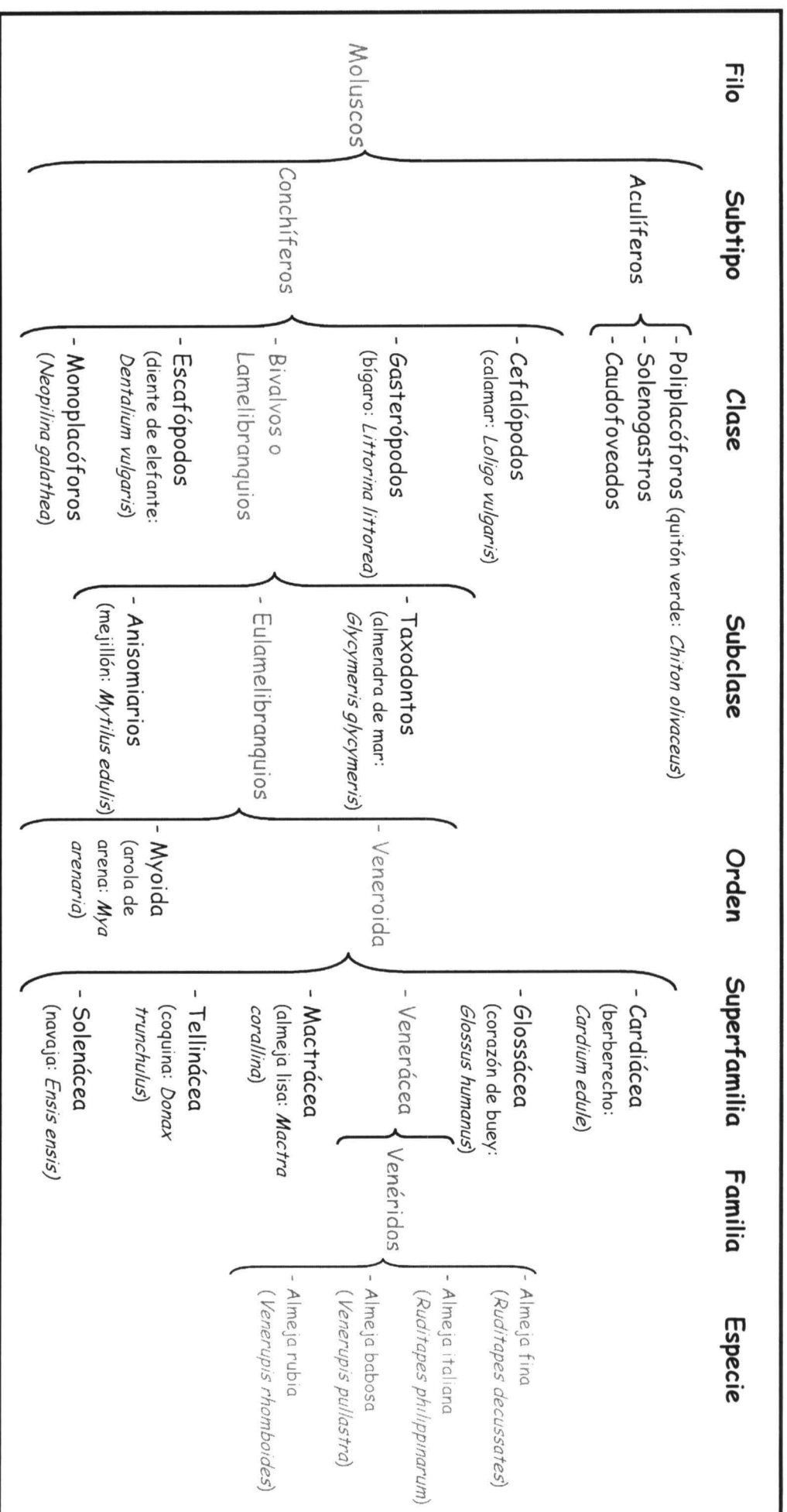


Figura 1. Clasificación taxonómica de la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*), babosa (*Venerupis pullastra*) y rubia (*Venerupis rhomboides*). Entre paréntesis se muestran ejemplos de cada nivel taxonómico (Lotina, 1992).

La clase Lamelibranquios, llamada así por el aspecto laminar de sus branquias, se caracteriza por tener una concha formada por dos valvas, por lo que también se llama Bivalvos. Estas especies presentan una escasa diferenciación cefálica y la forma del pie es parecida a un hacha. A esto se debe que los Lamelibranquios se llamen también pelecípodos, de las voces griegas *pélecus*=hacha, y *pus*=pie. Las dos valvas de su concha, que pueden ser parecidas o desiguales, están unidas entre sí mediante la charnela. Se trata de un sistema de denticulos situados en el borde superior de cada una de las valvas, que se articulan entre sí en entalladuras opuestas. El número de estos denticulos (que en algunos casos pueden faltar) es variable; por ello la articulación de las valvas tiene gran importancia en la clasificación de los diferentes grupos. Los moluscos Bivalvos o Lamelibranquios incluyen numerosas especies que se diferencian en sus branquias, cierre de valvas y músculos aductores, y engloban tres subclases: Taxodontos, Anisomarios y Eulamelibranquios (Lotina, 1992). Los Taxodontos tienen valvas con charnela formada por numerosos dientes de similar tamaño que se disponen en hilera, las branquias son plumosas o filamentosas y los músculos aductores son iguales, como en la almendra de mar (*Glycymeris glycymeris*). Por el contrario, los Anisomarios tienen valvas generalmente sin dientes apreciables, las branquias son filamentosas y los músculos aductores son desiguales, o bien pueden tener un solo músculo aductor. En esta subclase se encuentran especies muy valoradas comercialmente como el mejillón del Atlántico (*Mytilus edulis*), la ostra (*Ostrea edulis*) y la vieira (*Pecten jacobaeus*). La subclase Eulamelibranquios se caracteriza porque sus valvas tienen charnela con dientes desiguales (heterodontos), las branquias son filamentosas y sus dos músculos aductores son de tamaño similar.

Las almejas pertenecen a la clase Bivalvos o Lamelibranquios y dentro de ésta, a la subclase Eulamelibranquios. En esta Tesis Doctoral se han seleccionado las especies de almejas fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*), babosa (*Venerupis pullastra*) y rubia (*Venerupis rhomboides*) por ser las más representativas en el mercado español de almejas.

Subclase Eulamelibranquios

El nombre de Eulamelibranquios significa verdaderos lamelibranquios, es decir, tienen branquias filamentosas y cada una de ellas está formada por dos

series de láminas que se unen entre sí mediante conexiones interlaminares. En esta subclase se encuentran especies de gran interés comercial. La mayoría de los Eulamelibranchios son heterodontos, es decir, cierran sus valvas por medio de una charnela con dientes desiguales, en un número de tres como máximo.

En el interior de las valvas de los Eulamelibranchios se observan las huellas de dos músculos aductores que son iguales o casi iguales, a diferencia de los músculos aductores de los Anisomiaros, que son muy desiguales. El manto suele estar soldado en su zona posterior, lo que no ocurre en las especies de los Anisomiaros. La subclase Eulamelibranchios se divide en dos órdenes: Myoida y Veneroida. Las diferencias entre las especies de ambos órdenes se basan en la observación de la forma de la concha, el tipo de cierre de las valvas, la posición más o menos cerrada o abierta de éstas, las huellas de los músculos aductores, etc. Las especies del orden Myoida tienen valvas más o menos desiguales que suelen permanecer entreabiertas; el cierre de las valvas no tiene dientes apreciables, las conchas tienen forma ovalada más o menos alargada, y las huellas de los músculos aductores no son muy iguales ni están muy marcadas. Se incluyen en este orden especies como la arola de mar (*Mya arenaria*). Las especies del orden Veneroida, se diferencian de las del orden Myoida, en que sus valvas son iguales y suelen permanecer generalmente cerradas, la charnela es de tipo heterodonto, la concha adopta distintas formas predominando las ovoides o circulares, y las huellas de los músculos aductores son iguales y están bien marcadas.

El orden Veneroida se divide en unas quince superfamilias en las que se encuadran más de cuarenta familias con muchos géneros y especies. Entre las superfamilias más importantes cabe destacar la superfamilia Cardiácea, que incluye la familia Cárdidos, cuyas especies reciben este nombre por tener su concha forma de corazón, como el berberecho (*Cardium edule*). La superfamilia Glossácea, en la que se encuentra la familia Glósidos, se caracteriza porque el vértice de la concha está muy doblado hacia delante, como en el corazón de buey (*Glossus humanus*). Dentro de la superfamilia Mactrácea se distingue la familia Máctridos, cuyas conchas delgadas pueden ser redondeadas, triangulares o alargadas. La almeja lisa (*Mactra corallina*) sería un ejemplo de esta familia. Por otra parte, en la superfamilia Tellinácea cabe destacar la familia Donácidos, cuyas

especies tienen las conchas pequeñas y con forma entre triangular y trapezoidal, como es el caso de la coquina (*Donax trunculus*). En la superfamilia Solanácea se encuadra la familia Cultéllidos, en la que se encuentran especies como la navaja (*Ensis ensis*), cuya concha es larga, delgada y curvada en forma de sable (Lotina, 1992).

Las almejas pertenecen a la familia Venéridos (*Figura 1*), que es la familia más importante de la superfamilia Venerácea. Tienen dos músculos aductores con desarrollo similar, a diferencia de ostras y vieiras, que sólo tienen uno, y de las navajas, que tienen dos pero con distinto desarrollo. Su concha está formada por dos valvas iguales articuladas por medio de la charnela. Las valvas de la mayoría de las especies están marcadas por líneas concéntricas de crecimiento que se entrecruzan con otras líneas formando retículos. Se diferencian de los mejillones en que éstos tienen la concha de contorno casi triangular, mientras que las almejas tienen forma ovalada. Además, las almejas poseen sifones bien desarrollados, de los que carecen los mejillones. Según la especie de almeja de que se trate, existen diferencias en el color, forma y estriaciones de la concha (De Juana y De Juana A., 1987). Las almejas también difieren entre sí en otras características morfológicas, como la longitud, separación y color de los sifones que le sirven para captar y expulsar el agua de la que obtienen su alimento. La observación de estas características es el método que se emplea habitualmente para diferenciar las especies de almejas (Lotina, 1992).

***Ruditapes decussatus* (Linneo, 1758) o almeja fina**

La **almeja fina** (*Figura 2*) es la especie más apreciada por los consumidores debido a su exquisito sabor y textura y también es la especie que alcanza un mayor valor comercial. Al igual que las almejas babosa y rubia, sus capturas se distribuyen principalmente en dos áreas de pesca: el Atlántico y el Mediterráneo. Vive en la zona intermareal, siendo propia de los fondos de arena limpia, donde se entierra hasta una profundidad de 15-30 cm. Se aísla del exterior gracias al cierre hermético de sus valvas, manteniendo en el interior la cantidad de agua necesaria para sobrevivir. Su concha es de color blanco, amarillo o marrón claro y tiene el contorno ovalado, con la superficie esculpida por finas estrías concéntricas y radiales que le dan una apariencia de cuadrícula. Para su comercialización debe

alcanzar una talla mínima de 40 mm. Las de mayor tamaño se denominan “de cuchillo”, miden hasta 8 cm y con frecuencia se consumen en crudo.

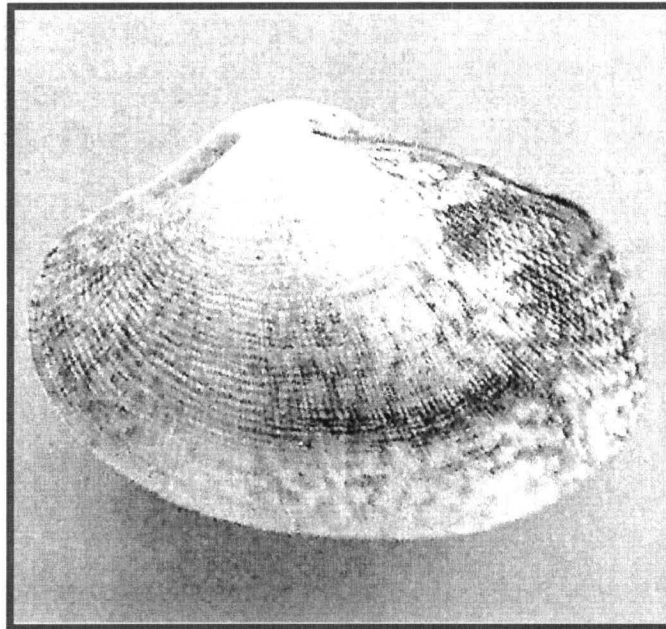


Figura 2. *Ruditapes decussatus* (almeja fina).

***Venerupis pullastra* (Lamark, 1818) o almeja babosa**

La **almeja babosa** (Figura 3) es similar a la fina. Se diferencia de ésta en que tiene una forma ovalada más alargada, y sus estriaciones son menos marcadas, especialmente las radiales, por lo que no suele llegar a formar cuadrículas. Es de color crema, gris o marrón, a menudo con manchas oscuras. Uno de los detalles que la diferencian de la almeja fina es la disposición de sus sifones; los sifones de la almeja fina se pueden separar casi desde la base, mientras que los de la almeja babosa, más cortos, están unidos hasta cerca de su borde superior (Figura 4). Tiene menor resistencia que la almeja fina a la permanencia fuera del agua, por lo que su valor comercial es menor. Es una especie apreciada por los consumidores, aunque no tanto como la almeja fina. Los ejemplares de almeja babosa se comercializan con una talla mínima de 38 mm.

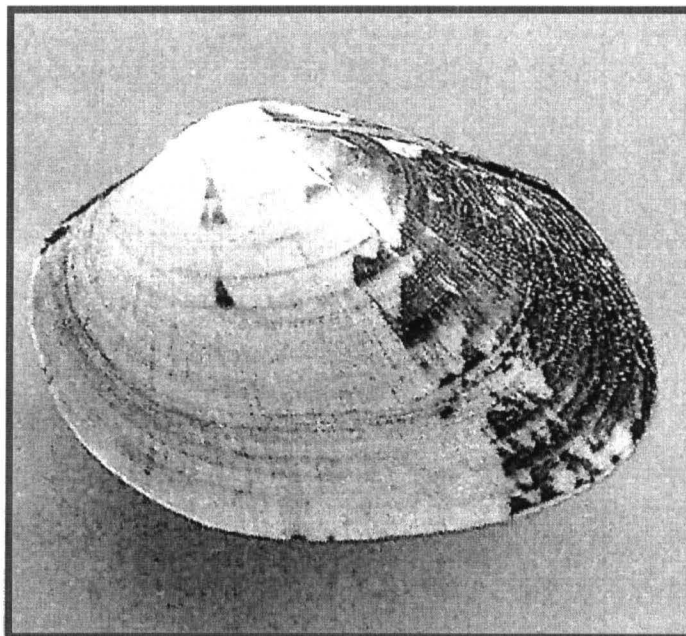


Figura 3. *Venerupis pullastra* (almeja babosa).

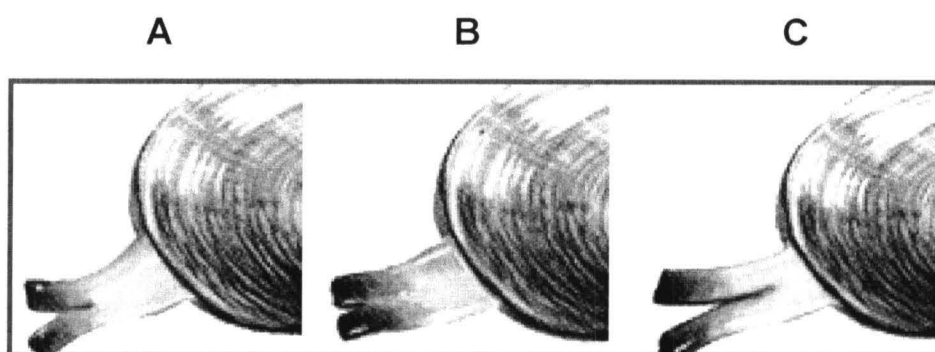


Figura 4. Características de los sifones de almeja italiana (A), babosa (B) y fina (C).

***Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) o almeja italiana**

La **almeja italiana, japonesa o cultivada** (*Figura 5*) se diferencia de la almeja fina en que tiene las estrías más marcadas. Los sifones en esta especie se encuentran separados al comienzo y unidos en los dos últimos tercios del recorrido (*Figura 4*). Las capturas españolas de esta especie en el medio natural no son significativas, aunque se cría en parques de cultivo en Asturias. Su talla mínima debe ser de 40 mm.

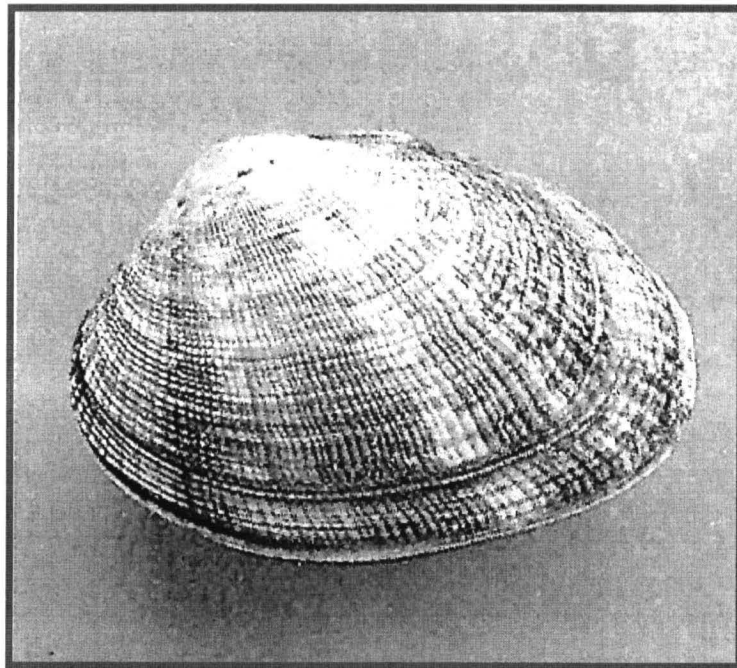


Figura 5. *Ruditapes philippinarum* (almeja italiana).

***Venerupis rhomboides* (Pennant, 1777) o almeja rubia**

La **almeja rubia** (*Figura 6*) vive enterrada en la arena y en la grava desde unos pocos metros bajo las aguas hasta más de 150 metros de profundidad, tanto en las costas del Atlántico europeo como en las del Mediterráneo. Tiene la concha de forma ovalada, con la superficie de sus valvas lisa y brillante y recorrida por muchas líneas concéntricas, pero ninguna radial. Su coloración crema, amarillenta o marrón anaranjada, a veces presenta líneas o dibujos de color más oscuro. Los sifones de la almeja rubia se encuentran totalmente unidos entre sí. Su precio es inferior al de las almejas fina y babosa. Se comercializa con una talla mínima 40 mm y se emplea principalmente para guisos.

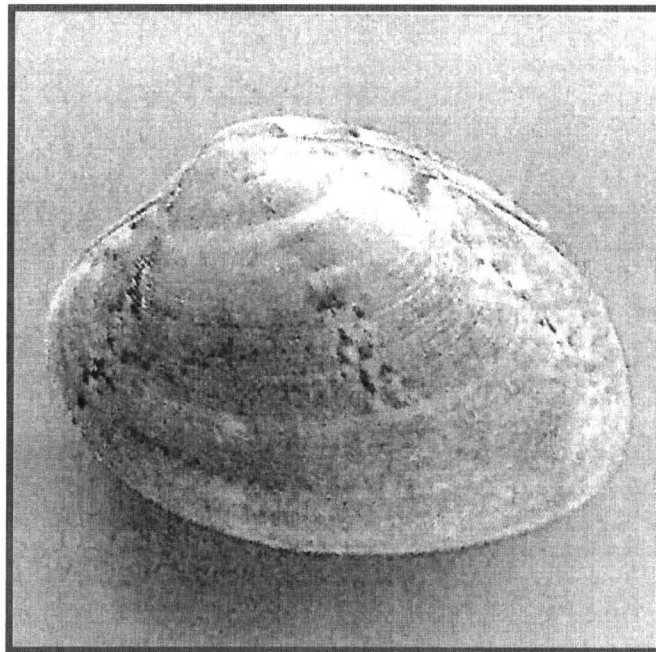


Figura 6. *Venerupis rhomboides* (almeja rubia).

II.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL MERCADO DE ALMEJAS EN ESPAÑA

II.2.1. CAPTURAS Y ACUICULTURA

Según los últimos datos de capturas de productos de la pesca (*Tabla 1*) publicadas por la FAO (*Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*), China lidera la producción con un 20% de las capturas mundiales, seguida de países como Japón, Estados Unidos, Rusia y Perú (FAO, 2000a). España es el segundo país en volumen de capturas de la Unión Europea, con un 6,5% del total de la producción comunitaria, como se muestra en la *Tabla 2*.

Los moluscos, con unas capturas de 6,6 millones de Tm anuales, representan el 7,66% del total de productos de la pesca capturados en el medio natural (*Tabla 3*). Los cefalópodos constituyen casi la mitad de este grupo, mientras que las capturas correspondientes a almejas, berberechos y arcas suponen el 12,4% de las capturas mundiales de moluscos (FAO, 2000a). Sin embargo, al considerar la producción de moluscos no se deben tener en cuenta únicamente las capturas en el medio libre, sino también las procedentes de la acuicultura, cuya importancia aumenta progresivamente. Según los últimos datos de la base de datos FAOSTAT, que considera todos los métodos de extracción; la producción mundial de moluscos (excepto cefalópodos) ascendió en 1997 a 12,58 millones de Tm, lo que supone el 10,3% de la producción mundial de pescados, moluscos y crustáceos. El principal productor es China, con un 67,15% de la producción mundial (*Tabla 4*), seguido a gran distancia por Japón (6,98%), Estados Unidos (5,06%), Corea del Sur (2,98%), Francia (1,93%) y España (1,68%). La presencia de nuestro país en los primeros puestos de producción de moluscos no se debe a la producción de almejas, sino de mejillones; bivalvo del que España es el primer productor en Europa con un volumen total de capturas de 276.000 Tm en el año 1999.

China es también el país que más capturas realiza de almejas, berberechos y arcas, con un 65,79% del total de capturas mundiales (*Tabla 5*). Asimismo destacan las producciones de Estados Unidos y Japón que alcanzaron en 1998, un 10,45% y 3,51% del total respectivamente.

Tabla 1. Capturas mundiales de pescados, moluscos y crustáceos (Tm), por países productores.

	1993	1994	1995	1996	1997	1998
China	9.351.437	10.866.836	12.562.706	14.222.306	15.722.344	17.229.957
Japón	7.247.828	6.617.308	5.967.290	5.936.130	5.882.299	5.259.089
EE.UU.	5.523.216	5.535.349	5.244.567	5.001.483	5.010.054	4.708.980
Rusia F.	4.370.009	3.705.082	4.311.809	4.676.666	4.661.853	4.454.759
Perú	9.004.777	11.999.217	8.937.342	9.515.048	7.869.871	4.338.437
Indonesia	3.085.045	3.315.629	3.503.769	3.557.623	3.649.200	3.698.850
Chile	5.949.565	7.720.578	7.433.902	6.690.993	5.811.567	3.265.306
India	3.118.815	3.209.969	3.219.583	3.474.064	3.601.554	3.214.765
Tailandia	2.927.868	3.012.256	3.013.268	2.963.399	2.912.203	2.900.320
Noruega	2.415.118	2.351.763	2.525.078	2.638.464	2.856.689	2.850.428
Rep. Corea	2.257.193	2.357.745	2.319.928	2.413.769	2.204.047	2.026.934
Filipinas	1.834.692	1.845.331	1.860.491	1.783.593	1.805.806	1.827.971
Islandia	1.715.581	1.556.962	1.612.548	2.060.168	2.205.944	1.681.951
Dinamarca	1.614.289	1.873.335	1.999.033	1.681.517	1.826.852	1.557.335
México	1.102.932	1.191.875	1.329.469	1.464.084	1.489.020	1.181.402
Malaysia	1.049.321	1.067.650	1.112.375	1.130.689	1.172.922	1.153.719
Vietnam	878.557F	960.498F	999.860F	1.028.500F	1.078.668	1.130.660
Argentina	931.051	948.757	1.147.368	1.248.718	1.351.066	1.128.823
España	1.070.379F	1.084.540F	1.141.219F	1.126.710	1.143.122	1.106.557F
China, Taiwán	1.133.676	967.209	1.010.021	967.483	1.038.048	1.076.288
Canadá	1.139.311	1.027.647	852.689	910.714	963.492	995.011
Resto países	18.787.479	19.234.210	20.346.155	18.981.229	19.333.107	19.511.858
Total	86.507.600	91.436.600	91.576.800	93.474.200	93.619.100	86.299.400

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Capturas, vol. 86 (1).

Tm = Toneladas métricas.

F= Estimación de la FAO partiendo de bases de datos disponibles.

Tabla 2. Capturas pesqueras de los países de la Unión Europea (Tm).

	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Dinamarca	1.614.289	1.873.335	1.999.033	1.681.517	1.826.852	1.557.335
España	1.070.379F	1.084.540F	1.141.219F	1.126.710	1.143.122	1.106.557F
Reino Unido	860.229	877.981	909.928	865.145	886.269	919.905
Francia	618.410	623.379	611.679	560.249	567.476	536.254
Suecia	341.897	386.814	404.572	370.881	357.406	410.886
Holanda	461.756	420.053	438.092	410.798	451.799	536.626
Italia	395.835	397.623	395.887	365.899	340.987	315.593
Irlanda	278.574	293.965	385.431	333.030	292.673	324.763
Portugal	287.802	263.187	260.584	260.422	221.923	223.961
Alemania	253.010	230.161	239.851	236.411	259.352	266.622
Finlandia	156.294	164.269	167.484	179.077	180.098	181.304
Grecia	166.877	190.963	165.323	162.413	170.487	128.238
Bélgica	36.098	34.256	35.599	30.823	30.500	30.835
Austria	420	388	404	450	465	451
Total	16.496.051	15.801.166	17.132.909	17.410.847	17.835.623	16.929.968

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Capturas, vol. 86 (1).

Tm = Toneladas métricas.

F= Estimación de la FAO partiendo de fuentes de información disponibles.

Tabla 3. Capturas mundiales de pescados, moluscos y crustáceos (Tm), por especies.

	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Arenques, sardinas, anchoas	21.991.072	25.871.047	22.010.845	22.302.989	21.596.852	16.539.574
Bacalaos, merluzas, eglefinos	9.919.598	9.723.062	10.732.477	10.765.803	10.364.350	10.332.547
Jureles, lisas, papardas	9.956.348	9.874.857	10.808.552	11.115.037	10.529.223	8.354.345
Gallinetas, lubinas, congrios	5.688.791	6.290.821	6.872.381	6.756.178	7.300.692	6.984.024
Atunes, bonitos, agujas	4.585.679	4.690.270	4.775.463	4.798.271	5.122.071	5.545.977
Caballas, sierras, peces-sable	4.016.009	4.536.008	4.692.665	5.107.212	5.284.903	4.985.495
Peces de agua dulce diversos	4.075.217	4.050.263	4.339.155	4.585.625	4.660.099	4.839.539
Platijas, halibuts, lenguados	1.098.174	983.306	916.262	946.905	1.024.984	925.638
Salmones, truchas, eperlanos	980.940	995.955	1.153.038	1.030.312	921.686	889.059
Sábalos	654.941	633.881	685.811	714.842	734.453	808.827
Tiburones, rayas, quimeras	742.058	757.333	758.230	808.837	808.341	800.129
Carpas, barbos y otros ciprínidos	673.593	756.242	782.078	664.693	616.556	603.331
Tilapias y otros cíclidos	520.689	520.857	585.003	569.365	562.036	598.453
Peces diádomos diversos	48.501	50.822	64.841	63.018	65.240	64.928
Anguilas	15.448	18.136	14.501	16.963	14.677	12.785
Esturiones, sollos	8.610	7.272	5.723	4.690	4.391	3.714
Peces marinos diversos	10.356.165	9.746.777	9.803.117	10.629.129	10.108.623	10.386.545
Gambas, camarones	2.081.805	2.287.289	2.336.835	2.454.989	2.600.256	2.713.450
Centollas, cangrejos	984.500	1.169.165	1.159.324	1.212.021	1.203.428	1.284.838
Crustáceos de agua dulce	215.878	253.195	316.288	409.172	525.978	646.711
Bogavantes, langostas	205.456	217.738	221.178	209.106	230.182	215.766
"Krill", crustáceos planctónicos	88.777	83.962	118.714	101.708	82.508	81.181
Galateas	5.681	7.382	10.793	14.253	19.387	22.109
Crustáceos marinos diversos	853.000	876.600	1.008.677	1.084.733	1.245.625	1.399.647
Calamares, jibias, pulpos	2.702.157	2.762.151	2.862.807	3.095.517	3.387.678	2.604.437
Almejas, berberechos, arcas	1.046.837	934.084	953.007	906.792	807.171	821.273
Moluscos de agua dulce	457.784	507.126	595.276	559.479	506.369	579.513
Vieiras	489.998	605.227	499.926	482.597	465.669	515.660
Mejillones	263.876	278.977	244.335	203.425	240.090	248.293
Ostras	155.357	165.155	194.095	187.863	184.737	157.409
Orejas de mar, bígaros, estrombos	91.852	100.399	102.033	110.353	116.634	90.070
Moluscos marinos diversos	1.135.326	1.236.275	1.424.793	1.068.038	1.623.755	1.598.385
Erizos de mar y otros equinodermos	112.353	122.956	133.800	124.319	116.477	106.447
Ascidias y otros tunicados	4.541	5.314	9.064	21.324	5.976	3.443
Límulos y otros arácnidos	810	634	926	1.598	2.607	3.252
Ranas y otros anfibios	4.245	4.066	3.627	2.955	3.584	2.631
Tortugas	811	1.012	842	1.105	944	849
Invertebrados acuáticos diversos	274.697	311.029	380.321	342.939	530.822	529.079
Total	86.507.600	91.436.600	91.576.800	93.474.200	93.619.100	86.299.400

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Capturas, vol. 86 (1).

Tm = Toneladas métricas.

Tabla 4. Producción de moluscos frescos* (Tm).

	1995	1996	1997
China	7.959.571	7.806.400	8.447.906
Japón	896.384	924.349	878.554
Estados Unidos	748.416	666.963	636.444
Corea del Sur	413.382	399.068	375.030
Francia	249.847	242.795	242.216
España	210.725	206.514	203.517
Italia	222.360	210.419	202.784
Total	12.247.794	12.019.836	12.580.130

Fuente: FAOSTAT, Base de datos estadísticos de la FAO.

Tm = Toneladas métricas.

* No se incluyen los cefalópodos.

Tabla 5. Producción de almejas, berberechos y arcas (Tm).

	1997	% total	1998	% total
China	1.768.061	63,55	2.004.878	65,79
Estados Unidos	343.226	12,34	318.581	10,45
Japón	109.076	3,92	107.054	3,51
Tailandia	84.094	3,02	44.551	1,46
Malasia	83.900	3,02	87.718	2,87
Italia	68.604	2,47	76.830	2,52
Corea, Rep	67.734	2,43	96.383	3,16
Indonesia	63.500	2,28	54.300	1,78
Canadá	33.337	1,20	32.498	1,06
Venezuela	33.270	1,20	28.276	0,92
Chile	31.679	1,14	41.880	1,37
Reino Unido	19.913	0,72	12.223	0,40
España	16.809	0,60	22.017	0,72
Holanda	10.923	0,39	68.133	2,23
Francia	8.012	0,29	11.531	0,37
Turquía	7.150	0,26	3.550	0,11
México	6.025	0,22	5.691	0,18
Portugal	5.980	0,21	6.183	0,20
Islandia	4.351	0,16	8.776	0,28
Cuba	2.989	0,11	2.899	0,09
Dinamarca	2.603	0,09	1.997	0,06
Otros países	9.128	0,33	11.349	0,37
Total	2.782.361	100,00	3.047.298	100,00

Fuente: FAOSTAT, Base de datos estadísticos de la FAO.

Tm = Toneladas métricas.

Las capturas españolas en el grupo de almejas, berberechos y arcas representaron un 0,72% del total en 1998 (Tabla 5). Conviene señalar que en este

grupo se incluyen numerosas especies y que la importancia relativa de cada una de ellas depende de las áreas de captura y de los distintos países.

No obstante, actualmente está adquiriendo una gran importancia la cría de almejas mediante acuicultura. Las almejas se comercializan cultivándolas desde su nacimiento y realizando lo que se denominan cultivos integrales o artificiales. Para ello es necesario cubrir diversas etapas (Lotina, 1992):

- Obtención y fecundación de los huevos.
- Cuidado y alimentación progresiva de las larvas y almejas pequeñas.
- Traslado de las almejas en pleno desarrollo a lugares en comunicación directa con el mar.

Además de la almeja fina (*R. decussatus*), actualmente se cultivan otras especies de almejas como la babosa (*V. pullastra*) y la italiana (*R. philippinarum*). Esta última, de origen japonés, se ha introducido en los mercados europeos y se adapta muy bien a la cría en factorías.

Según los últimos datos de producción mundial de acuicultura de peces, moluscos y crustáceos (FAO, 2000b), la almeja italiana (*R. philippinarum*) es la sexta especie en importancia en este tipo de cultivos con una producción de 1.426.501 Tm en el año 1998, y un valor económico de 1.860 millones de dólares (Tabla 6). El primer puesto en cuanto a volumen de producción y valor económico lo ocupa la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) con una producción de 3.438.824 Tm (3.268 millones de dólares). A continuación figuran distintas especies de carpa, como la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpa china (*Ctenopharyngodon idella*), carpa (*Cyprinus carpio*) y carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*). Sin embargo, hay otras especies de pescados y mariscos que, a pesar de tener menor importancia en cuanto a volumen de producción, tienen un gran valor económico, como el camarón (*Penaeus monodon*), el salmón (*Salmo salar*) y el rohu (*Labeo rohita*), con un valor económico de 3.859, 2.203 y 1.944 millones de dólares respectivamente (Tabla 6). Dentro de los moluscos, las especies de mejillón *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* siguen en volumen de producción y valor económico a la ostra del Pacífico y la almeja italiana.

Tabla 6. Producción mundial y valor económico de peces, moluscos y crustáceos obtenidos mediante acuicultura en 1998.

	Producción (Tm)	Valor económico*
Ostra del Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	3.438.824	3.268
Carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	3.308.419	3.085
Carpa china (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	2.894.017	2.655
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	2.465.283	2.828
Carpa cabezona (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	1.584.289	1.448
Almeja italiana (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	1.426.501	1.860
Camarón (<i>Penaeus monodon</i>)	577.990	3.859
Salmón (<i>Salmo salar</i>)	687.906	2.203
Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	754.677	1.944
Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>)	499.891	258
Mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	160.731	111

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Productos de Acuicultura, vol. 86 (2).

Tm= Toneladas métricas.

* en millones de dólares americanos

En España, como se ha indicado anteriormente, la acuicultura es una actividad que está adquiriendo un gran desarrollo en los últimos años, con una producción total de peces, moluscos y crustáceos de 313.518 Tm, lo que supone un valor económico de aproximadamente 282 millones de dólares (FAO, 2000b). Este incremento de la producción acuícola ha sido espectacular, pasando en lo que se refiere a peces marinos de 400 Tm en 1985 a casi 15.000 Tm en 1.999 y, en peces de río, de 16.000 Tm a 31.000 Tm en el mismo período. Sin contar el mejillón, el cultivo de moluscos ha pasado de 4.000 Tm a 14.000 Tm en el período citado. Según los últimos datos de la FAO (FAO, 2000b), la especie de mejillón *Mytilus edulis* es la especie más importante en acuicultura con una producción que representó el 83,2% del total en 1998. En la *Tabla 7*, se indican los datos más recientes de la producción de acuicultura de las siete especies más importantes en España: mejillón (*Mytilus edulis*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), dorada (*Sparus aurata*), ostra (*Ostrea edulis*), almeja babosa (*Venerupis pullastra*), rodaballo (*Psetta maxima*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja fina (*Ruditapes decussatus*). A continuación se exponen los datos sobre capturas y

acuicultura referentes a las especies de almejas objeto de estudio: almeja fina, italiana, babosa y rubia.

Tabla 7. Producción española de peces, moluscos y crustáceos procedentes de la acuicultura.				
	1996	1997	1998	
	(Tm)	(Tm)	(Tm)	%valor
Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>)	188.462	188.793	261.062	83,26
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	25.000	29.000	30.000	9,56
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	3.818	3.969	4.933	1,57
Ostra (<i>Ostrea edulis</i>)	2.600	2.370	2.545	0,81
Almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	1.929	3.105	2.408	0,76
Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	2.189	1.800	1.969	0,62
Almeja italiana (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	85	140	1.630	0,51
Almeja fina (<i>Ruditapes decussatus</i>)	751	1.210	1.096	0,34
Total	231.556	239.136	313.518	100,00

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Productos de Acuicultura, vol. 86 (2).
Tm= Toneladas métricas.

Producción de almeja fina (*Ruditapes decussatus*)

Las capturas de esta especie se distribuyen principalmente en dos áreas de pesca: el Atlántico y el Mediterráneo. Según datos de la FAO, el volumen de capturas mundiales de almeja fina, sin considerar las procedentes de la acuicultura, fue de 1.653 Tm en 1998 (*Tabla 8*). El 63,5% de las capturas de almeja fina en el medio natural se realizaron en España, principalmente en Galicia (*Figura 7*). En Francia se produjo un aumento considerable en el volumen de capturas desde el año 1991, que representó el 30,8% en 1998. Por otra parte, la producción acuícola de almeja fina tiene lugar sobre todo en Portugal, España, Francia e Irlanda (FAO, 2000b), alcanzando 4.874 Tm en 1998 y un valor económico total de aproximadamente 46 millones de dólares (*Tabla 11*).

Tabla 8. Capturas nominales de almeja fina (Tm).

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
España	448	221	339	447	761	1088	1050F
Francia	180	202	99	39	106	71	510
Túnez	1.383	1.538	1.036	1.343	396	77	57
Portugal	15.070	8.028	1.638	169	185	27	33
Irlanda	209	-	-	20	21	23	3
Reino Unido	-	-	-	-	-	2	-
TOTAL	17.290	9.989	3.112	2.018	1.469	1.228	1.653

Tabla 9. Capturas nominales de almeja italiana (Tm).

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Japón	59.038	57.356	46.597	49.466	43.703	39.660	36.807
Rep.Corea	13.016	31.202	14.595	15.041	12.393	16.854	14.585
China	400	26	24	16	-	-	-
TOTAL	72.454	88.584	61.216	64.523	56.095	56.514	51.392

Tabla 10. Capturas nominales de almeja babosa (Tm).

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Francia	1.156	1.166	1.461	638	934	1.493	2.216
España	334	350	432	450	1.734	2.146	2.005F
Portugal	64	213	573	225	158	419	240
TOTAL	1.554	1.729	2.466	1.305	2.826	4.058	4.461

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Capturas, vol. 86 (1).

Tm= Toneladas métricas.

F= Estimación de la FAO partiendo de fuentes de información disponibles o calculada sobre la base de suposiciones específicas.

... No hay datos; no han podido obtener datos; datos no disponibles por separado pero incluidos en otra partida estadística.

- Ninguna; cantidad que se sabe es nula o cero; especificada en la fuente original como nada o cantidad insignificante sin otra indicación de su magnitud.

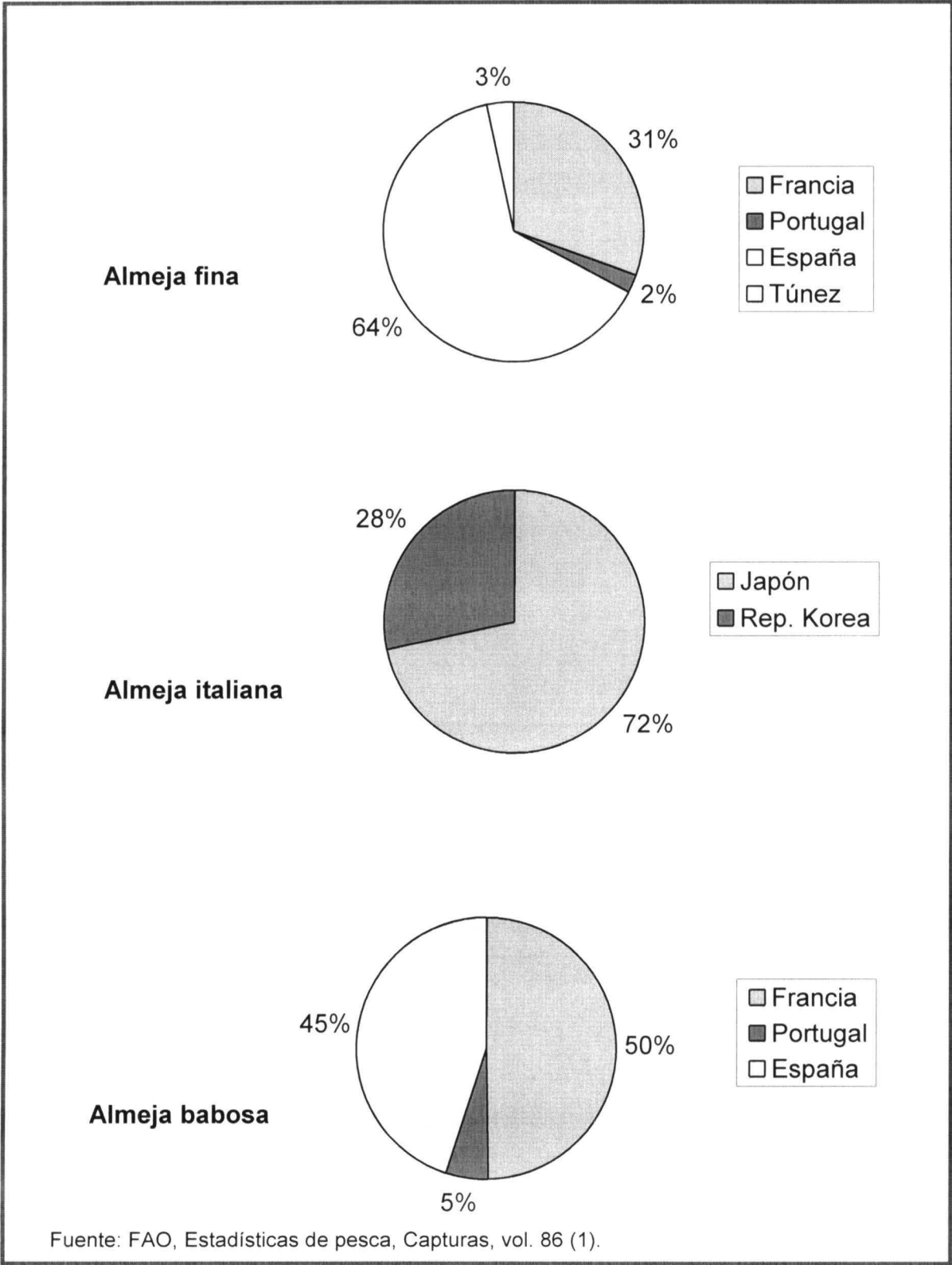


Figura 7. Distribución por países de las capturas mundiales de almeja fina (*R. decussatus*), almeja italiana (*R. philippinarum*) y almeja babosa (*V. pullastra*).

Tabla 11. Producción de acuicultura de almeja fina (Tm).

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Portugal	3.050	2.700	2.225	1.815	1.814	3.259	3.325
España	3.531	3.581	4.614	5.199	751	1.210	1.096
Francia	224	266	734	200	200	250	250
Irlanda	79	84	110	103	125	200	178
Argelia	3	10F	16	17	15F	15F	22
Islas del Canal	5	-	7	2	3	2	3F
Reino Unido	1	1	0	-	-	-	-
TOTAL	6.893	6.642	7.706	7.336	2.908	4.936	4.874

Tabla 12. Producción de acuicultura de almeja italiana (Tm).

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
China	576.114	913.259	1.106.573	1.069.275	1.093.948	1.257.488	1.404.443
Rep.Corea	54.402	10.046	19.035	15.260	18.478	13.958	17.178
EE.UU.	1.920	2.887	1.047	2.374	1.803	2.263	1.896
España	85	140	1.630
China,Taiwán	785	1.395	1.205	1.364	1.208	719	923
Francia	197	197	400	400
Reino Unido	48	51	21	17	21	36	31
TOTAL	633.646	927.638	1.128.638	1.088.487	1.115.740	1.275.204	1.426.501

Tabla 13. Producción de acuicultura de almeja babosa (Tm).

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
España	1.929	3.105	2.408
Portugal	-	-	2	0	-	1	-
TOTAL	2	0	1.929	3.106	2.408

Fuente: FAO, Estadísticas de pesca, Capturas, vol. 86 (2).

Tm Toneladas métricas.

F Estimación de la FAO partiendo de fuentes de información disponibles o calculada sobre la base de suposiciones específicas.

... No hay datos; no han podido obtener datos; datos no disponibles por separado pero incluidos en otra partida estadística.

- Ninguna; cantidad que se sabe es nula o cero; especificada en la fuente original como nada o cantidad insignificante sin otra indicación de su magnitud.

La producción procedente de la acuicultura de la almeja fina en nuestro país aumentó considerablemente en 1995, año en que alcanzó el primer lugar en la tabla de producción mundial de esta especie (70,8% de la producción total). No obstante, la acuicultura de la almeja fina en España experimentó en 1996 un descenso, constituyendo actualmente el 22,45% de la producción mundial de dicha especie. Esta especie se cultiva también en Francia e Irlanda, con una producción acuícola en 1998 que representó el 5,12% y 3,6% del total, respectivamente.

Las capturas de almeja fina en el medio natural se han reducido notablemente en países como Túnez y Portugal (*Tabla 8*). No obstante, en este último país, se ha producido un gran incremento de la producción acuícola, que representó el 68,2% de la producción total de esta especie en 1998 (*Tabla 11*).

Producción de almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*)

La almeja italiana, ocupa un papel destacado en la producción mundial de acuicultura (*Tabla 6*). Esta especie se cultiva sobre todo en China, aunque también en Estados Unidos, Italia, Francia y España, entre otros países. El volumen total de capturas mundiales de almeja italiana en el medio natural fue de 51.392 Tm en 1998 (*Tabla 9*). Japón se encuentra a la cabeza con un 71,6% del total, seguido de la República de Corea con un 28,3% (*Figura 7*). En los últimos años, Japón ha experimentado un ligero descenso en el volumen de este tipo de capturas, mientras que en Corea la tendencia es inversa.

China es el principal productor de almeja italiana, a pesar de que desde el año 1996 su volumen de capturas en el medio natural es insignificante (*Tabla 9*). La *Tabla 12* muestra como la producción de acuicultura de esta especie en China experimentó un importante aumento entre 1992 y 1998, lo que convierte a este país en el primer productor mundial con una producción de 1,4 millones de toneladas (98,45% del total). La República de Corea también aumentó su producción acuícola en 1992, para descender acusadamente en los años siguientes hasta constituir el 1,2% de la producción mundial en 1998. Estados Unidos ha mantenido una producción acuícola estable cercana a los 2.000 Tm, constituyendo el 0,13% de la producción mundial. Las capturas españolas de esta especie en el medio natural no son significativas, aunque en los últimos años está adquiriendo mayor importancia y se ha comenzado a cultivar en parques. En España el cultivo de esta

especie comenzó en 1996 y desde entonces se ha desarrollado de forma espectacular, llegando a ser la producción del año 1998 diecinueve veces superior a la de 1996, aunque sólo constituya el 0,11% de la producción mundial (*Tabla 12*).

Producción de almeja babosa (*Venerupis pullastra*)

La almeja babosa se localiza principalmente en las costas europeas del Atlántico y en menor proporción en las del Mediterráneo. El volumen de capturas mundiales de almeja babosa en 1998 fue de 4.461 Tm, de las que un 49,7% corresponden a Francia (*Figura 7*), seguida de España (44,8%) y Portugal (5,3%). Las capturas portuguesas disminuyeron considerablemente en 1998 con relación al año anterior, mientras que en España la producción se mantuvo estable, y en Francia aumentó en comparación con el año 1997 (*Tabla 10*). Según los datos de la FAO (FAO, 2000b), España es el primer y único país que produce almeja babosa en acuicultura. Los primeros datos corresponden a 1996 con una producción cercana a las 2.000 Tm. Entre los años 1996 y 1997 aumentó la producción, aunque en 1998 se produjo una ligera disminución hasta las 2.208 Tm, con un valor económico de 19 millones de dólares (*Tabla 13*).

Producción de almeja rubia (*Venerupis rhomboides*)

En las Estadísticas de Pesca de la FAO no se dispone de datos de capturas relativos a esta especie, que se incluiría en el grupo de “Otros Venéridos no especificados”, cuyas capturas mundiales ascendieron a 4.971 Tm en 1998. La almeja rubia vive enterrada en la arena y en la grava, desde unos pocos metros bajo las aguas hasta más de 150 metros de profundidad, tanto en las costas del Atlántico europeo como en las del Mediterráneo.

II.2.2. COMERCIO EXTERIOR DE ALMEJAS

La producción española de almejas en 1997 alcanzó las 8.371 Tm (FAO, 2000c), de las que según las estadísticas de la Subdirección General de Caladero Nacional, Acuicultura y Recursos Litorales, 5.591,4 Tm correspondieron a producción de acuicultura marina. En 1998, la producción se elevó a 10.694 Tm, siendo la producción acuícola de 5.831,3 Tm, a pesar de lo cual es insuficiente para hacer frente a la demanda interna, que depende de las importaciones.

En la *Tabla 14*, se muestran los datos del comercio exterior de productos de la pesca en los últimos años. Como se puede apreciar, durante 1999 España

importó 10.025 Tm de almejas y otras especies de la familia Venéridos, lo que supuso un ligero descenso (3%) con relación a las importaciones del año anterior. Este descenso se siguió produciendo en el año 2000, en el que se importaron 9.382 Tm. En su mayoría procedían de Italia y Francia y correspondían a las especies italiana y babosa, respectivamente (*Tabla 15*).

Con un valor económico de más de 3.000 millones de pesetas anuales, las importaciones de almejas son las más importantes del grupo de los Bivalvos y representaron en 1999, el 3,4% en peso y el 3,1% en valor del total de importaciones españolas de moluscos. Sin embargo, el impacto de esta actividad en el conjunto de la economía nacional sólo representó el 0,18 por mil de las importaciones de bienes y servicios.

Las exportaciones españolas de almejas son poco significativas si se comparan con las de mejillones, de los que nuestro país es el segundo productor mundial. De las 786 Tm de almejas que España exportó en el año 2000, más del 88% tuvieron como destino Portugal.

Conviene señalar que aunque en los últimos años se está potenciando el cultivo industrial de almejas, especialmente en el litoral Cantábrico, no es previsible que el crecimiento de este sector de la acuicultura pueda cubrir la demanda interna a corto plazo (Fernández y col., 2000b).

II.2.3. CONSUMO Y COMERCIALIZACIÓN DE ALMEJAS EN ESPAÑA

En España se consumen anualmente unos 30 Kg de productos de la pesca por persona (31,3 kg por persona en el año 1999), lo que nos sitúa entre los países con mayor consumo del mundo de estos productos. Según los datos recogidos en el Panel de Alimentación elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2001), el gasto total en productos de la pesca aumentó en España un 12,3% en hogares y un 0,2% en centros de restauración colectiva respecto al año anterior, suponiendo un coste de 1.262 miles de millones de pesetas. Los productos de la pesca representan el 13% del gasto alimentario de los hogares españoles, mientras que los productos cárnicos suponen el 22% y el 65% el resto de productos alimentarios. El consumo total de productos de la pesca aumentó un 4,9% en hogares y un 1,1% en extradoméstico, con relación al año 1999.

Tabla 14. Comercio exterior español de pescados y productos de la pesca.

	Volumen (Tm)			Valor (millones Pts)		
	1997	1998	1999	1997	1998	1999
EXPORTACIONES						
Pescado fresco	73.499	70.188	73.938	31.139	33.474	49.216
Pescado congelado	309.661	315.972	366.857	57.201	54.837	56.356
Filetes y demás carne de pescado	25.004	26.445	33.131	13.432	12.569	18.969
Pescado seco, salado, etc	11.622	10.392	12.673	7.962	8.791	8.448
Crustáceos	12.100	12.527	31.792	14.111	13.818	21.405
Moluscos	122.059	133.787	148.265	47.031	48.892	48.831
Total	553.945	569.311	666.656	170.876	172.381	203.225
Ostras	117	284	315	55	110	85
Mejillones	20.259	20.157	22.215	2.154	2.390	2.703
Almejas	655	794	675	181	230	228
IMPORTACIONES						
Pescado fresco	202.471	212.844	216.302	96.146	101.243	110.591
Pescado congelado	313.172	366.427	348.228	73.077	92.582	77.853
Filetes y demás carne de pescado	88.948	114.373	90.008	33.335	45.204	36.703
Pescado seco, salado, etc	50.503	51.279	48.981	24.042	29.767	31.322
Crustáceos	107.300	12.528	124.183	106.520	134.105	128.778
Moluscos	263.401	285.372	293.527	94.028	100.095	95.861
Total	1.025.795	1.042.823	1.121.229	427.148	502.996	481.108
Ostras	1.390	1.694	948	685	883	604
Mejillones	3.283	5.339	5.564	458	845	957
Almejas	8.896	10.337	10.025	3.283	3.170	2.981

Fuente: Dep. de Aduanas e Impuestos Especiales. Ministerio de Hacienda.

Tabla 15. Comercio exterior español de almejas y otras especies de venéridos.

PAÍSES	IMPORTACIONES				EXPORTACIONES			
	1999		2000*		1999		2000*	
	kg	Mill. Pts.	kg	Mill. Pts.	kg	Mill. Pts.	kg	Mill. Pts.
Italia	6.821.745	1848,3	6.666.529	2.286,8	13.587	11,3	241.650	70,9
Francia	1.627.248	667,2	1.052.631	565,7	10.016	5,6	12.862	10,9
Reino Unido	321.224	103,5	309.279	63,2	6.812	3,5	25.873	10,9
P. Bajos	305.808	86,6	499.926	103,6	110	0,4	840	0,23
Irlanda	60.270	21,7	118.735	37,7	-	-	-	-
Portugal	48.560	19,6	97.812	22,6	570.136	176,6	452.570	150,1
Dinamarca	12.069	5,1	3.057	0,7	-	-	-	-
Bélgica	-	-	-	-	3.516	2,1	870	0,4
Alemania	-	-	35	0,3	42.201	18,0	23.806	9,1
Austria	-	-	-	-	60	0,06	60	0,06
Total CE	9.196.924	2.752	8.747.969	3.080,6	646.438	217,5	758.471	252,5
Perú	679.724	187,2	531.281	142,1	-	-	-	-
EE.UU.	107.226	31,9	84.603	29,5	-	-	-	-
Tailandia	16.550	5,2	8.000	0,3	-	-	-	-
Marruecos	23.026	3,2	1.100	0,4	-	-	-	-
Chile	500	1,2	7.854	2,8	-	-	-	-
Islandia	1.410	0,4	1.280	0,3	-	-	-	-
Argentina	-	-	-	-	17.226	7,2	4.890	3,1
México	-	-	-	-	5.734	2,0	11.532	6,6
Cuba	-	-	-	-	1.978	0,5	1.840	0,8
Uruguay	-	-	-	-	1.176	0,3	7.481	3,3
Rep. Dominicana	-	-	-	-	980	0,3	1.322	0,7
Suiza	-	-	-	-	960	0,3	890	0,2
Malta	-	-	100	0,2	900	0,3	-	-
Total Otros Países	828.436	229,2	634.118	175,6	28.954	10,9	27.955	14,7
Total	10.025.360	2981,2	9.382.087	3.256,2	675.392	228,4	786.426	267,2

Fuente: Dep. de Aduanas e Impuestos Especiales. Ministerio de Hacienda

* Datos provisionales

Los precios de los productos de la pesca aumentaron un 7,1% en hogares y descendieron un 0,9% en centros de restauración. Por consiguiente, en el año 2000 se incrementó el consumo de los productos de la pesca a pesar de haberse incrementado su precio.

El aumento del consumo de los productos de la pesca en hogares, expresado en Kg por habitante, se distribuye de forma diferente según productos. Los pescados frescos aumentaron de 11,29 en 1999 a 11,82 en 2000, mientras que los mariscos, moluscos y crustáceos aumentaron de 6,16 en 1999 a 6,31 en 2000 y las conservas de pescados y moluscos de 3,22 a 3,66. Sin embargo, el consumo de pescados congelados permaneció invariable de 2,74 en 1999 a 2,75 en 2000. Considerando globalmente la cesta de la compra, las frutas frescas son los alimentos que han experimentado un mayor incremento en el consumo a lo largo del año 2000, y el pan, los productos de la pesca, los productos cárnicos y las hortalizas frescas han experimentado un aumento moderado (*Figura 8*).

Sin embargo, los datos presentados en el Panel no permiten conocer el porcentaje de almejas dentro del conjunto de los mariscos, ni tampoco el consumo de almejas por persona y año. Por lo tanto, para conocer la importancia relativa del consumo de las distintas especies de almejas en España podemos utilizar como referencia los datos proporcionados por Mercamadrid, S. A., que por su volumen de comercialización se considera el segundo mercado de productos de la pesca del mundo, sólo superado por el de Tokio. Según se muestra en la *Tabla 16*, de las 1.602 Tm de almejas comercializadas en el año 2000, el 5% correspondió a almeja fina, el 20% a almeja babosa, el 25% a almeja rubia y el 50% a la almeja italiana, procedente principalmente de la acuicultura. Durante 1999, la cantidad de almejas comercializadas fue superior al año 2000 (2.364 Tm), pero las proporciones de las distintas especies de almejas se han mantenido constantes. Entre las cuatro especies existen marcadas diferencias de precio. La almeja más apreciada por su textura y sabor es la almeja fina, cuyo precio de orientación aproximadamente duplica al de la almeja rubia, y es superior al de la almeja babosa. La almeja italiana es la que tiene un menor valor comercial, aproximadamente un tercio del de la almeja fina (*Tabla 16*).

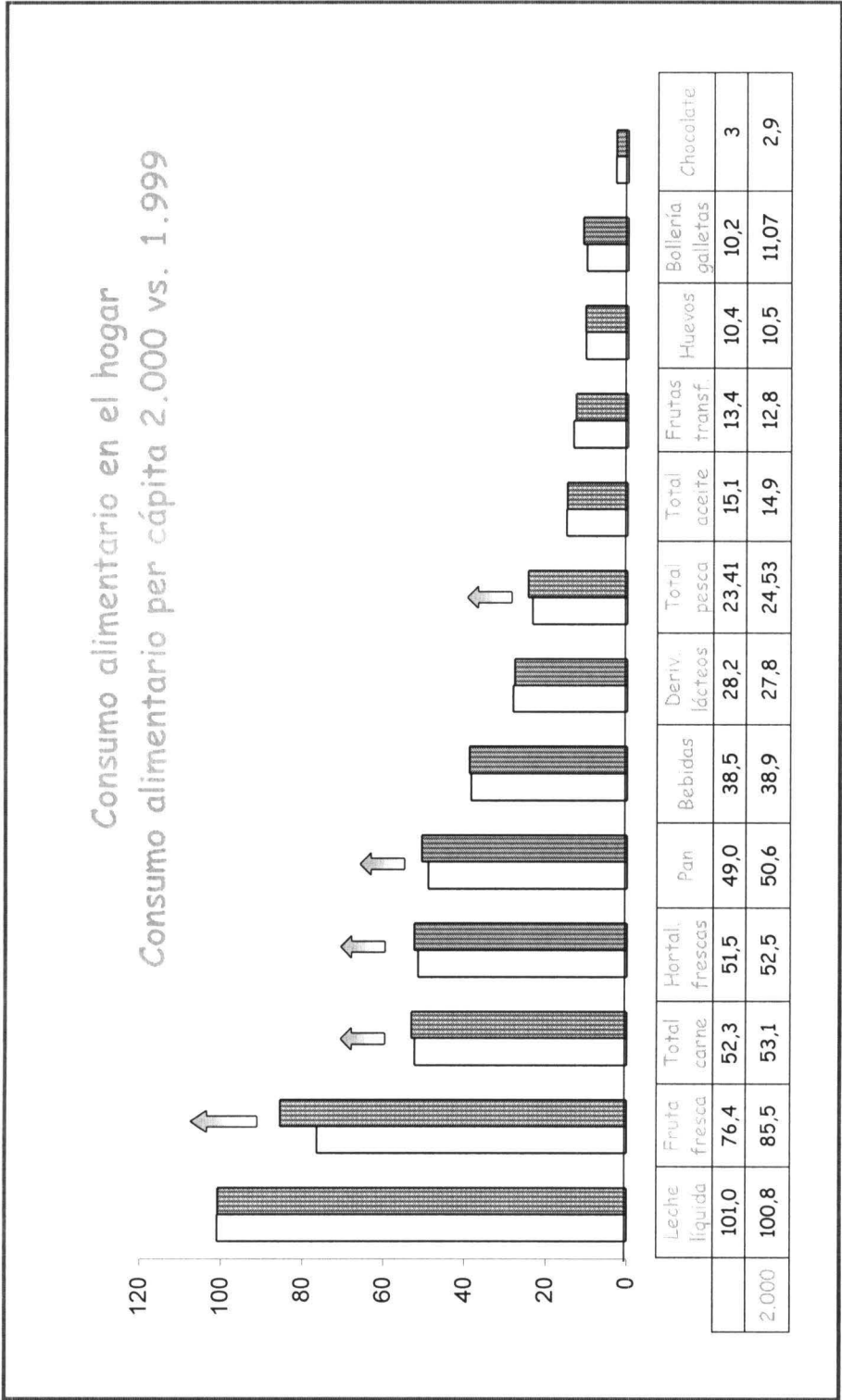


Figura 8. Consumo alimentario en el hogar.

Tabla 16. Comercialización de almejas en Mercamadrid.

Especie	1999			2000			
	Tm	Pts/Kg	% peso	Tm	Pts/Kg	% peso	% valor
Fina	117	2.505	5,0	80	2.496	5,0	7,83
Babosa	470	1.623	20,0	320	1.898	20,0	23,82
Rubia	588	1.142	25,0	401	1.150	25,0	18,04
Italiana	1.175	702	50,0	801	829	50,0	26,02
Total	2.364	1.087	100	1.602	1.593	100	100

En su conjunto, el valor de las almejas comercializadas en Mercamadrid en el año 2000 ascendió a unos 2.500 millones de pesetas (15 millones de euros). Sin embargo, debido a las diferencias en la cotización de las distintas especies, aunque sólo el 5% en peso correspondieron a almeja fina, su valor económico alcanzó el 7,83% del total. Por el contrario, la mitad de las almejas comercializadas correspondieron a la almeja italiana, pero su valor económico sólo representó el 26,02% del total.

II.3. INFORMACIÓN AL CONSUMIDOR: ASPECTOS LEGALES.

La comercialización de los alimentos en general, y de los productos de la pesca en particular, se basa en que el consumidor disponga, mediante el etiquetado, de información clara y suficiente sobre la identidad y calidad de los productos expuestos a la venta. Estos aspectos no sólo influyen sobre la venta directa de productos al consumidor, sino también sobre las transacciones realizadas entre empresas suministradoras de materia prima y de productos elaborados. Todo ello, justifica la necesidad de una reglamentación que proteja los intereses de todos los sectores implicados.

El etiquetado de los alimentos se regula por la *Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios*, recogida en el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio (B.O.E. de 24 de agosto de 1999). Esta norma incorpora al ordenamiento jurídico nacional la Directiva 97/4/CE del Parlamento

Europeo y del Consejo, de 27 de enero (D.O.C.E. núm. L43, de 14 de febrero de 1997), que ha sido sustituida recientemente por la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de marzo (D.O.C.E. núm. L109, de 6 de mayo). La finalidad de esta normativa es garantizar, por medio del etiquetado, la información y protección de los consumidores y el respeto a la lealtad en las transacciones comerciales.

La Norma general de etiquetado contempla, en su Capítulo IV, Artículo 5, relativo a la *Información obligatoria del etiquetado*, la obligatoriedad de indicar la denominación de venta del producto. Sin embargo, teniendo en cuenta los términos recogidos en el Artículo 6, relativo a la *Denominación de venta*, resulta bastante difícil establecer qué se entiende realmente por dicha denominación en el caso de los productos de la pesca.

En consecuencia, esta Norma general resulta insuficiente para permitir la normalización de los diversos productos pesqueros, que con frecuencia se conocen con distintos nombres regionales en cada uno de los estados miembros. El problema se agrava para aquellas especies procedentes de áreas geográficas muy alejadas de los países de la Unión Europea.

Artículo 6. *Denominación de Venta.*

1. La denominación de venta de un producto alimenticio será la denominación prevista para este producto en las disposiciones de la Comunidad Europea que le sean aplicables.

- a) A falta de disposiciones de la Comunidad Europea, la denominación de venta será la denominación prevista por las disposiciones legales, reglamentarias o administrativas que le sean aplicables en España.

En defecto de lo anterior, estará constituida por el nombre consagrado por el uso en España, o por una descripción del producto alimenticio y de su utilización, si fuera necesario, lo suficientemente precisa para permitir al comprador conocer su naturaleza real y distinguirlo de los productos con los que pudiera confundirse.

- b) Se admitirá también la utilización de la denominación de venta con la que el producto se fabrique y comercialice legalmente en el Estado miembro de procedencia.

Sin embargo, cuando la aplicación de las disposiciones de la presente Norma, en particular las previstas en el artículo 5, no sean suficientes para permitir a los consumidores conocer la naturaleza real del producto y distinguirlo de los productos con los que pudiera confundirlo, la denominación de venta deberá completarse con otras indicaciones descriptivas que habrán de figurar en su proximidad.

- c) En casos excepcionales, la denominación de venta del Estado miembro de procedencia no se utilizará cuando el producto que designe se diferencie, desde el punto de vista de su composición o de su fabricación, del producto conocido bajo esta denominación hasta el punto de que las disposiciones del párrafo b) no basten para garantizar una información correcta a los consumidores.

El Real Decreto 331/1999, de 26 de febrero (B.O.E. de 18 de marzo), de *normalización y tipificación de los productos de la pesca frescos, refrigerados o cocidos*, y el Real Decreto 571/1999 de 9 de abril (B.O.E. de 10 de abril), *por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la comercialización de moluscos bivalvos vivos*, resuelven en parte este problema. En ellos se indica que todos los productos pesqueros frescos, refrigerados o cocidos (Real Decreto 331/1999) y los moluscos bivalvos vivos (Real Decreto 571/1999), además de cumplir con lo establecido en la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, deberán llevar en el envase o embalaje correspondiente, una etiqueta en la que en caracteres legibles e indelebles se contemplen como mínimo unas determinadas especificaciones, entre las que se incluyen el **nombre científico y comercial de la especie**.

La obligatoriedad de incluir el nombre científico de la especie en la etiqueta permite una normalización adecuada de los diversos productos. También es necesario, sin embargo, incluir el nombre comercial de la especie. Para evitar cualquier grado de ambigüedad entre las especies habituales y las denominadas especies afines (entendiendo como tales aquéllas que, siendo diferentes presentan atributos morfológicos semejantes, pudiendo inducir por ello a tipificaciones erróneas), el Real Decreto 331/1999 establece, en su artículo 6 que la denominación comercial de determinadas especies se ajuste a lo previsto en el Anexo IV. En dicho anexo, se indican las denominaciones comerciales y científicas de algunas especies de interés.

Por otra parte, el 10 de febrero de 2000 entró en vigor el Reglamento (CE) N° 104/2000 del Consejo de 17 de diciembre de 1999, por el que se establece la *organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura* (D.O.C.E. núm. L17 de 21 de enero de 2000). En su Capítulo 2, relativo a *Información del consumidor*, el Artículo 4 establece que los productos de la pesca entre los que se incluyen los moluscos, incluso separados de sus valvas, vivos, frescos, refrigerados, congelados, secos, salados o en salmuera; no podrán ser comercializados, salvo que una presentación o un etiquetado apropiado indique:

1. La denominación comercial de la especie.
2. El método de producción (captura o cría).

3. La zona de captura.

A efectos de la denominación comercial de la especie, los estados miembros establecerán y publicarán, a más tardar el 1 de enero de 2002, la lista de las denominaciones comerciales admitidas en su territorio, *como mínimo* de todas las especies enumeradas en los anexos I a IV de dicho Reglamento. Esta lista indicará respecto de cada especie el nombre científico, la denominación en la lengua o lenguas oficiales del Estado miembro y, en su caso, la denominación o denominaciones aceptadas o toleradas a nivel local o regional. Las almejas *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Tapes spp.*, *Veneridae* y *Mercenaria mercenaria*, se encuentran en el anexo V, junto con otras especies de pescados y moluscos como ostras, mejillones, lubina, rodaballos, truchas, salmones del Atlántico, anguilas, carpas y doradas.

Como se deduce de las disposiciones legales mencionadas, existe una preocupación real en la Unión Europea por establecer las bases para una correcta normalización y tipificación de los productos de la pesca, para lo que es preciso disponer de un catálogo completo en el que se relacionen los nombres científicos y comerciales de las especies de pescados y mariscos de consumo habitual. Pero además, para garantizar el cumplimiento de estas normas, es necesario desarrollar técnicas analíticas rápidas y fiables con las que verificar la identidad biológica de las especies comercializadas.

II.4. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PESCADO Y MARISCO.

Los productos de la pesca y acuicultura se pueden identificar atendiendo a criterios morfológicos cuando conservan intactas sus características anatómicas esenciales. En el caso de los moluscos bivalvos, y concretamente de las almejas, con frecuencia se adquieren vivas, lo que permite a las personas entrenadas diferenciarlas por las características de su concha y otras regiones anatómicas. Sin embargo, también pueden comercializarse sin concha como productos frescos, congelados, enlatados o formando parte de platos preparados o semielaborados. En estos casos, los criterios habituales de identificación resultan insuficientes para establecer la identidad biológica de las especies comercializadas, o para demostrar su presencia en productos que las contienen.

En otros productos de origen animal, como los pescados y derivados, productos cárnicos y lácteos, con cierta frecuencia se cometen fraudes de sustitución de unas especies por otras, o se declaran porcentajes de mezcla diferentes de los utilizados en su elaboración. Por ello, el desarrollo de métodos analíticos para identificar el origen animal de un producto, ha constituido una preocupación constante de las autoridades sanitarias.

Las técnicas utilizadas en identificación de especies cuando no se dispone de base anatómica se pueden dividir en dos grandes grupos: aquéllas basadas en el análisis de proteínas y las que se centran en el análisis del ADN o técnicas genéticas (Mackie y col., 1999). Los métodos basados en el análisis de proteínas han sido los más utilizados (Martín y col., 1989; Carrera y col., 1997; Céspedes y col., 1999a). No obstante, los grandes avances realizados en los últimos años en las técnicas de ingeniería genética, y en concreto en el desarrollo y puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han marcado un antes y un después en todas las áreas de investigación biomédica y han demostrado ser muy eficaces en la identificación de especies, tanto de pescado, como de animales y plantas (Meyer y Candrian, 1996).

La aplicación de estas técnicas en la identificación de especies de moluscos ha sido escasa y su objetivo ha consistido principalmente en el análisis genético de poblaciones y el estudio de relaciones filogenéticas entre especies, más que la diferenciación de especies de interés comercial (Martínez-Lage y col., 1995; Heath y col., 1995). Por este motivo, los métodos de identificación recogidos en esta memoria comprenden tanto los utilizados para especies de moluscos, como para pescados y crustáceos.

II.4.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas son la expresión del genoma propio de cada especie y poseen carácter informativo (secuencia aminoacídica), siendo esta característica la que permite establecer diferencias entre las especies.

En el músculo se distinguen tres grupos principales de proteínas (Mackie, 1996):

- Las **proteínas sarcoplásmicas**, que constituyen un 20-35% de las proteínas totales, se extraen fácilmente con agua o soluciones salinas diluidas. Esta

fracción, es la que presenta mayores variaciones interespecíficas, incluso entre especies estrechamente relacionadas (Slattery y Sinclair, 1983; Hofmann, 1987). Por este motivo son las que se utilizan con mayor frecuencia para la identificación de especies, tanto en las técnicas electroforéticas como en las inmunológicas y cromatográficas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas proteínas se desnaturalizan cuando se someten a tratamientos térmicos intensos (Dowdie y Biede, 1983; Yowell y Flurkey, 1986), por lo que el análisis de esta fracción proteica puede resultar inadecuado para la identificación de especies en productos tratados por calor.

- Las **proteínas miofibrilares**, que constituyen el 65-75% de las proteínas totales, se extraen empleando soluciones salinas de elevada fuerza iónica. De entre ellas, la miosina, actina, tropomiosina y troponina son las proteínas mayoritarias. Aunque sus secuencias de aminoácidos son muy conservadas entre especies, resisten tratamientos térmicos de cierta intensidad, por lo que pueden ser importantes en la identificación de especies cuando el producto ha sido sometido a una desnaturalización por calor.
- Las **proteínas del tejido conjuntivo**, representan de un 3-10% del contenido proteico total. Son insolubles en soluciones salinas y es necesario el empleo de soluciones ácidas o básicas para su completa disolución. En este grupo se incluyen la elastina y el colágeno, siendo esta última la más abundante. Al igual que sucede con las proteínas miofibrilares, resultan de interés en la identificación de especies de pescado cuando se trata de productos desnaturalizados por calor.

Los métodos basados en el análisis de proteínas, que se utilizan para la identificación de especies de pescado y marisco, incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), así como las técnicas inmunológicas.

II. 4.1.1. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

La electroforesis de proteínas musculares es el método de análisis más utilizado para la identificación de especies de pescado y marisco (Rehbein, 1990; Mackie, 1996). Mediante esta técnica se obtienen perfiles electroforéticos específicos que se pueden comparar con muestras auténticas de referencia,

obtenidas con el mismo método de extracción de las proteínas, condiciones electroforéticas y procedimiento de tinción (Lundstrom, 1980; Durand y col., 1985; Rehbein y col., 1995a).

Las técnicas electroforéticas se basan en la separación de moléculas cargadas en un medio acuoso, en nuestro caso proteínas, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos, uno positivo y otro negativo. El movimiento de las proteínas en el gel que sirve de soporte para la separación, dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del tampón seleccionado para el análisis.

Las proteínas son moléculas cargadas, pero su carga neta depende del pH de la solución en la que se encuentran, ya que éste determina el grado de ionización de sus grupos amino y carboxilo. Las proteínas con elevada carga neta tenderán a moverse más rápidamente que aquéllas con menor carga y, a igualdad de carga, se desplazarán más rápidamente las moléculas más pequeñas (*Figura 9*) (Mackie, 1996). Al valor de pH en el que la carga de la proteína es cero se le conoce como valor pI o punto isoelectrónico, y es característico de cada proteína.

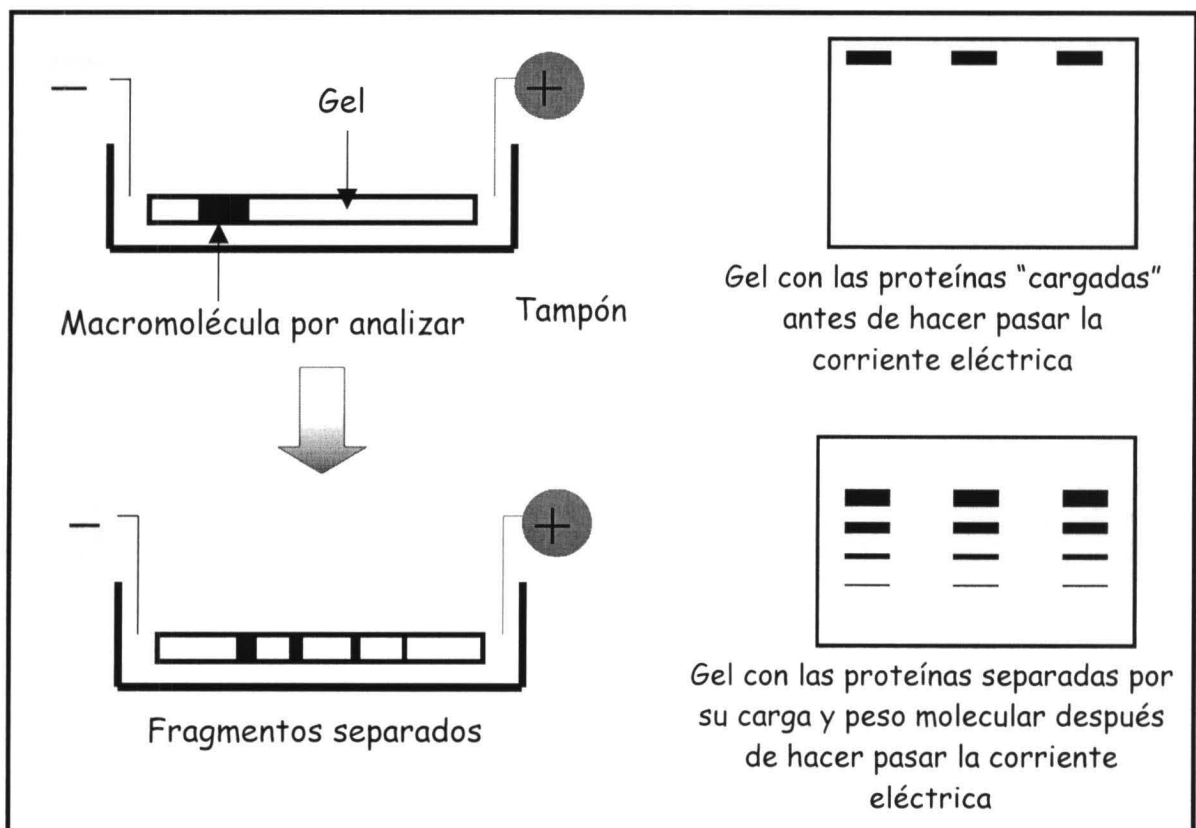


Figura 9. Técnica de electroforesis en gel.

La identificación de especies se realiza comparando el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras problema, con los patrones de bandas de muestras de referencia. Esta comparación puede ser visual, o utilizando un densitómetro o un analizador de imágenes (Sotelo y col., 1993). No obstante, para comparar los patrones de bandas es necesario analizar las muestras de referencia en el mismo gel que las desconocidas, ya que pequeños cambios en las condiciones experimentales pueden alterar los perfiles proteicos obtenidos (AOAC, 1995). Cuando se emplea la técnica electroforética de isoelectroenfoque, se pueden utilizar fotografías o geles de muestras de referencia obtenidos anteriormente (AOAC, 1995), e incluso patrones recogidos en bases de datos, ya que se trata de una técnica cuyos resultados son reproducibles (Rehbein y col., 1995a; Bossier y Cooreman, 2000).

Para la identificación de especies de pescado y marisco se pueden utilizar diversas técnicas electroforéticas dependiendo del tipo de procesado que haya experimentado el producto analizado. Con muestras de pescado y marisco que no han sufrido ningún tratamiento térmico, como ocurre con los productos frescos o congelados, se emplean extractos proteicos acuosos procedentes del músculo. En este caso, se utilizan técnicas de electroforesis convencional en diversos soportes o bien técnicas de isoelectroenfoque que permiten alcanzar un mayor poder de resolución.

En productos tratados por calor, la situación es diferente, debido a que las condiciones del procesado (cocinado, ahumado) dan lugar a distintos grados de desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas (Etienne y col., 1999). En estos casos, existen alternativas para el análisis electroforético, como la extracción de proteínas termoestables como las parvoalbúminas (Plowman y Herbert, 1992; Rehbein, 1992; Rehbein y col., 2000), la extracción y análisis de proteínas solubilizadas con detergentes o con urea (An y col., 1988) e incluso el análisis de las proteínas desnaturalizadas y sometidas a un proceso de fragmentación con bromuro de cianógeno o con proteasas (Sotelo y col., 1993).

En la actualidad, el isoelectroenfoque, método oficial de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995) y la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), son los sistemas electroforéticos más utilizados para la identificación de especies de pescados y

mariscos. Aunque también se están empezando a utilizar otras técnicas como la electroforesis capilar (EC) (Rehbein, 1990). Sin embargo, estas técnicas electroforéticas apenas se han aplicado a la identificación de especies de bivalvos (Etienne y col., 2000).

II.4.1.1.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato-sódico (SDS-PAGE)

Esta técnica se basa en la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida a los que se incorpora el detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). El SDS provoca una carga neta negativa en las proteínas e interacciona con sus regiones hidrofóbicas dividiéndolas en subunidades que se separan según su tamaño. La cantidad de detergente que se incorpora por unidad de masa es la misma para todas las proteínas, y en consecuencia, la movilidad en la electroforesis dependerá exclusivamente de la masa. El empleo de SDS o urea para la extracción de las proteínas a partir de muestras cocinadas y de muestras de surimi, permite obtener perfiles específicos mediante esta técnica.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una buena herramienta para el análisis de las proteínas debido a la flexibilidad de este soporte, un gel formado por monómeros de acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ y el dímero N,N'-metilenbisacrilamida como agente de unión. Esta técnica, con algunas modificaciones, ha permitido la identificación de determinadas especies en productos sometidos a esterilización o a intensos tratamientos térmicos. Aunque, como se ha indicado anteriormente, el manejo de la acrilamida requiere precaución, debido a su toxicidad y a las dificultades que a veces experimenta la polimerización del gel.

Coduri y Rand (1972), emplearon la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida para la diferenciación de especies de pescados (*Hippoglossus hippoglossus*, *Gadus canarias*, *Gadus morhua*, etc.), así como la almeja, raya y vieira. Mediante esta técnica se observaron distintos perfiles proteicos para dichas especies de pescados y mariscos, que permitían detectar sustituciones de unas especies de pescado por otras, o bien la sustitución de músculos de almeja y aletas de raya por vieiras.

An y col. (1988), emplearon la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) para diferenciar e identificar tres especies de langostinos (rosa, *Penaeus duorarum*; blanco, *Penaeus setiferus* y de roca, *Sicyonia brevirostris*) tanto crudos como cocidos. Para la obtención de los extractos proteicos compararon la eficacia de varios disolventes: agua, una solución de ClNa 0,1 M, SDS al 1% y una solución 8 M de urea. En las muestras de langostino crudo, los extractos acuosos determinaron un patrón electroforético característico de cada especie. Sin embargo, en las muestras tratadas por calor, la cantidad de proteínas extraídas con agua fue menor y no se obtuvieron perfiles específicos de especie. El SDS mejoró la extracción y el número de bandas proteicas observables en el gel, haciendo posible la identificación de los langostinos cocidos.

Civera y Parisi (1991), identificaron 18 especies de cangrejo, langosta, gamba y camarón en productos crudos y cocinados mediante la técnica de SDS-PAGE. Utilizaron geles con alta concentración de poliacrilamida para mejorar la resolución.

Hu y col. (1992), identificaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida las larvas de tres especies de bivalvos (*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* y *C. virginica*). Comprobaron que esta técnica constituye una herramienta útil para estudios taxonómicos, genéticos y ecológicos de distintos estados larvarios de especies de bivalvos.

Kitts y col. (1997), utilizaron la técnica de SDS-PAGE para la identificación de varias especies de moluscos bivalvos (vieiras, almejas y ostras). Comprobaron que con geles de poliacrilamida al 12% los perfiles obtenidos a partir de extractos proteicos del músculo aductor eran específicos de especie.

Rehbein y col. (1999a), llevaron a cabo un estudio en 8 laboratorios diferentes, con el fin de identificar especies de pescado (*Gadus morhua*, *Pleuronectes platessa*, *Melanogrammus aeglefinus*, etc.). Este estudio se realizó en muestras sometidas a tratamiento térmico (85°C) y utilizando geles comerciales. Compararon los resultados obtenidos por SDS-PAGE con los de IEF en geles de poliacrilamida con urea, concluyendo que el IEF resultaba más adecuado para la identificación de especies muy próximas filogenéticamente, ya que detectaba una mayor variedad de parvoalbúminas. La técnica de SDS-PAGE, por el contrario,

facilitaba la identificación de la especie de procedencia en muestras que habían sido sometidas a intensos procesos de lavado, como los productos tipo surimi, de bajo contenido en parvoalbúminas, pero con mayor concentración de miosinas.

Mackie y col. (2000), compararon las técnicas isoelectroenfoque y SDS-PAGE para identificar salmónidos ahumados y crudos (*Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, etc.). Este estudio, realizado en varios laboratorios, mostró que con la técnica de SDS-PAGE no era posible diferenciar pescados ahumados como *S. trutta* y *S. salar*, ya que los perfiles obtenidos fueron idénticos. Comprobaron que la técnica de urea-IEF era la más adecuada para la diferenciación de especies de los géneros *Salmo* y *Oncorhynchus*, aunque la técnica de SDS-PAGE tenía mayor poder de resolución para algunas especies como *S. alpinus* y *O. mykiss*.

Etienne y col. (2000), trataron de identificar tres especies de moluscos: almeja fina (*Ruditapes decussatus*), berberecho (*Cerastoderma edule*) y almeja de Vietnam (*Meretrix lyrata*) mediante electroforesis de las proteínas del músculo aductor extraídas con SDS. Con la técnica de SDS-PAGE no se encontraron variaciones intraespecíficas en los perfiles electroforéticos obtenidos, ni tampoco variaciones entre muestras cocidas y crudas, lo cual permitió la identificación de las 3 especies de moluscos (Figura 10). Estos autores concluyeron que aunque las tres técnicas electroforéticas: IEF, urea-IEF y SDS-PAGE, se podían utilizar para la identificación de las tres especies de moluscos, las de urea-IEF y SDS-PAGE eran más adecuadas para muestras tratadas térmicamente, ya que se evitaban los posibles problemas que tenía la técnica de IEF en cuanto a diferencias en los perfiles de muestras tratadas y no tratadas.

Etienne y col. (2001), también emplearon diferentes técnicas electroforéticas (IEF, urea-IEF y SDS-PAGE) para identificar filetes de 6 especies de pescado reestructurado y de muestras tratadas con altas presiones hidrostáticas (*Gadus morhua*, *Salmo salar*, *Pollachius virens*, entre otros). Las proteínas obtenidas de las muestras crudas y filetes reestructurados no se desnaturalizaron por el procesado y los tres métodos resultaron adecuados para la identificación de las especies. Pero, en muestras sometidas a altas presiones, los métodos de urea-IEF y SDS-PAGE resultaron los más apropiados, debido a que se producía una desnaturalización parcial de las proteínas.

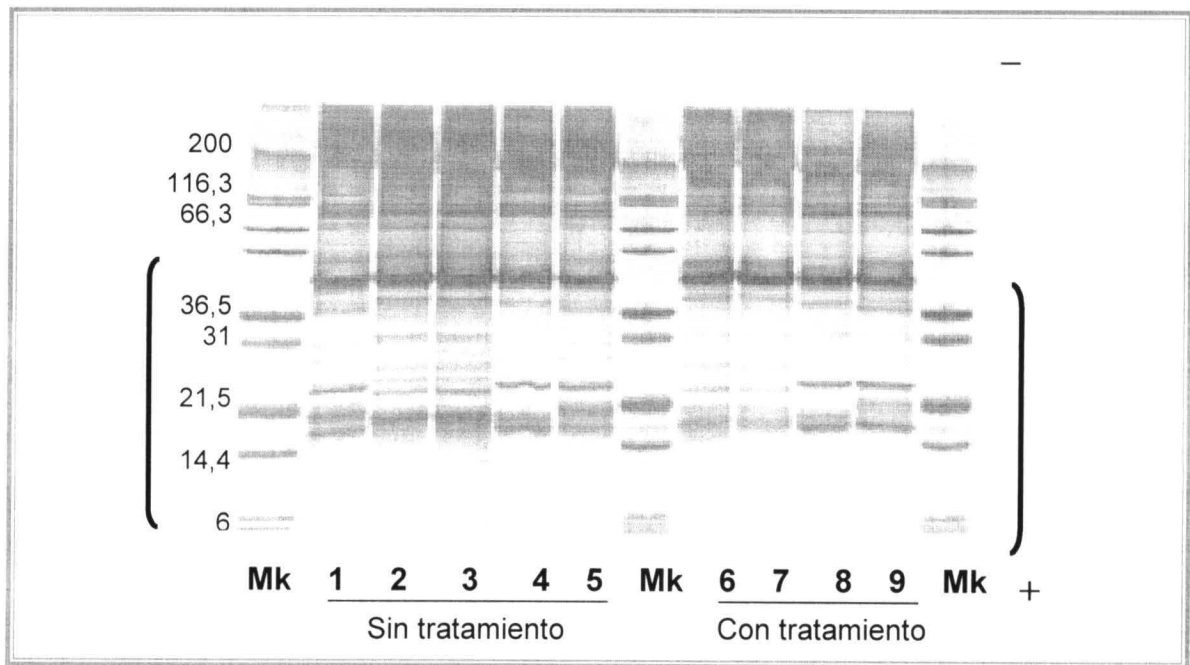


Figura 10. Perfil electroforético obtenido mediante SDS-PAGE del músculo aductor de tres especies de moluscos: almeja de Vietnam (2,3 y 6,7), almeja fina (1,5,9) y berberecho (4,8). Mk= Patrón de peso molecular de proteínas (Etienne y col., 2000).

Los principales inconvenientes de la técnica de SDS-PAGE derivan de la complejidad en los perfiles proteicos obtenidos y de la necesidad de disponer de personal entrenado e instrumental especializado.

II.4.1.1.2. Isoelectroenfoque (IEF)

El isoelectroenfoque es una técnica de electroforesis caracterizada por la creación de un gradiente de pH entre el ánodo y el cátodo, mediante la colocación o el movimiento a posiciones de neutralidad eléctrica de una mezcla de anfolitos sintéticos seleccionados previamente. Cuando las proteínas están presentes en este medio junto con los anfolitos, migran a lo largo del gradiente de pH localizándose en aquellas posiciones en las que su carga neta es cero (el pH es igual a su pI). En esta posición cesa la migración de las proteínas y precipitan en bandas muy finas, en las que los puntos de isoelectroenfoque pueden diferir en 0,02 unidades de pH. Por tanto, en esta técnica, la separación depende del punto isoelectroforético de la proteína y no de su carga y tamaño (*Figura 11*).

La técnica de isoelectroenfoque se puede realizar tanto en geles de poliacrilamida, como en geles de agarosa tratada químicamente (*agarosa IEF*). La

agarosa no presenta los inconvenientes de neurotoxicidad, dificultades en la polimerización y largos períodos de desteñido que presenta la acrilamida (Hamilton, 1982; An y col., 1989b). No obstante, la resolución que se obtiene con los geles de agarosa es menor, aunque en ocasiones suficiente para identificar incluso especies próximas filogenéticamente (Laird y col., 1982). Los inconvenientes que presenta la poliacrilamida se pueden evitar mediante el empleo de geles comerciales (Merchante y Ortín, 1993).

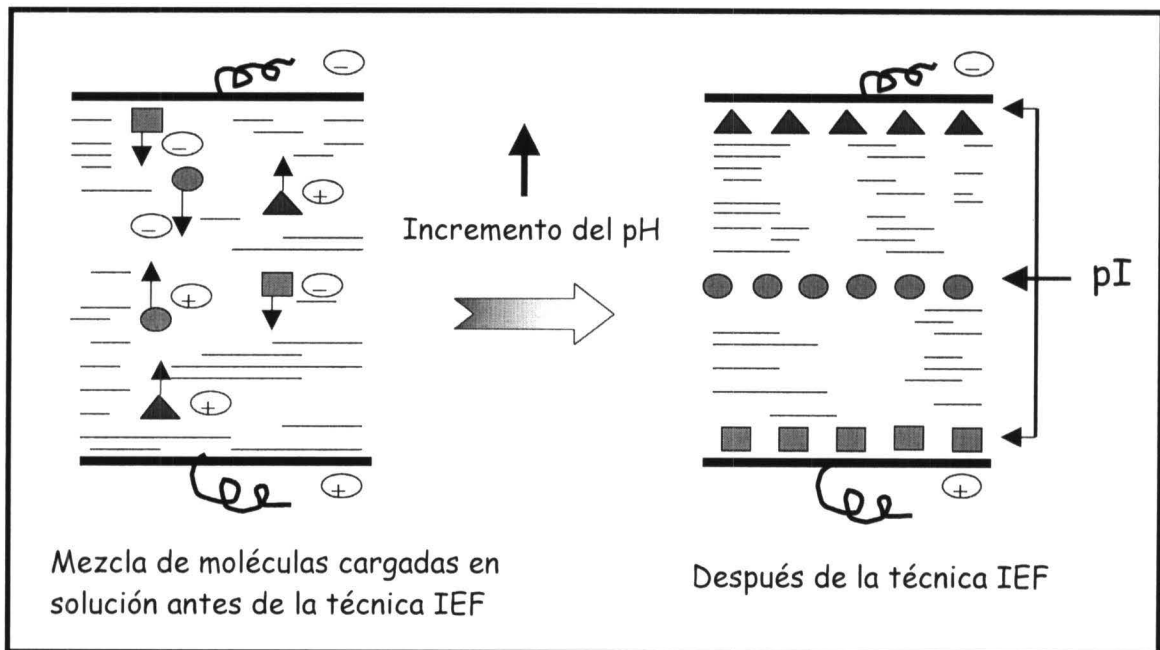


Figura 11. Técnica de Isoelectroenfoque. Principio de separación (Mackie, 1996).

Wiggin y Krzynowek (1983), compararon la eficacia de las técnicas de IEF en poliacrilamida y en agarosa para identificar seis especies de cangrejos (*Callinectes sapidus*, *Cancer borealis*, etc.), almejas (*Spisula solidissima*), mejillones (*Mytilus edulis*), langostas (*Panulirus argus*) y langostinos de roca (*Sicyonia* spp.). Estos autores comprobaron que se obtenía mejor resolución y se acortaba el tiempo de análisis utilizando geles de agarosa sin urea en lugar de geles de poliacrilamida con urea; aunque para la extracción de las proteínas los mejores resultados se obtenían con 10M de urea.

Otros investigadores (Hamilton, 1982; Abrams y col., 1984) también han obtenido resultados muy satisfactorios en la identificación de especies de pescado

fresco, congelado, escabechado o sometido a tratamiento térmico moderado (hasta 60-70°C), empleando la técnica de isoelectroenfoque en geles de agarosa. Sin embargo, Laird y col. (1982) obtuvieron mejor resolución en la identificación de especies cuando emplearon soportes de poliacrilamida en la técnica de IEF en lugar de geles de agarosa.

La técnica de IEF en geles de poliacrilamida sin agentes desnaturalizantes se ha utilizado para la identificación de pescados (Neti y Rehbein, 1998; Piñeiro y col., 1999) y mariscos (An y col., 1989b) que no han sufrido tratamiento térmico intenso. Sin embargo, cuando se analizan proteínas musculares desnaturalizadas por calor, la electroforesis se debe realizar en condiciones que permitan separar proteínas extraídas con detergentes como el dodecil-sulfato-sódico (SDS) o con urea. También se pueden obtener perfiles específicos de especie a partir de proteínas desnaturalizadas por calor si previamente se fragmentan con proteasas o con bromuro de cianógeno, que rompe las proteínas por los residuos de metionina (Gross y col., 1996).

Secchi y col. (1982), emplearon la técnica de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con urea para detectar diferencias entre 11 especies de moluscos (*Venus verrucosa*, *Mytilus galloprovincialis*, *Pecten jacobaeus*, *Ostrea edulis*, etc.). Comprobaron que obtenían mejores resultados extrayendo las proteínas musculares con urea y detergentes no iónicos, por su bajo efecto desnaturalizante y su eficiencia en la solubilización de las proteínas.

An y col. (1989a; 1989b), desarrollaron una técnica de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con urea para la diferenciación de tres especies de langostinos (*Penaeus duorarum*, *Penaeus setiferus* y *Sicyonia brevirostris*) a partir de muestras crudas y tratadas por calor. Al extraer las proteínas de las muestras con agua obtuvieron mejores resultados que con las extraídas con SDS o urea.

Gangar y col. (1996), utilizaron las técnicas de IEF y electroforesis en dos dimensiones (2-DGE) para identificar carne de cangrejo (*Callinectes sapidus*). Realizaron la extracción de las proteínas tanto con agua como con urea y comprobaron que con agua se obtenía menor cantidad de proteínas en las muestras tratadas con calor. Tanto en muestras frescas como sometidas a tratamiento térmico no detectaron diferencias en los perfiles electroforéticos que se

debieran al sexo, localización anatómica o al momento del año en que se recogieran las muestras, aunque sí observaron diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas. Sin embargo, las muestras tratadas por calor procedentes de cangrejos de Taiwan produjeron perfiles de IEF diferentes a las muestras de Carolina del Sur (EE.UU.) y a las muestras congeladas de China. Ninguna de las dos técnicas consiguió diferenciar muestras pasterizadas y enlatadas procedentes de diferentes localizaciones, a pesar de extraer las proteínas con urea.

Etienne y col. (1999) y Rehbein y col. (1999a), realizaron ensayos interlaboratoriales empleando geles comerciales de poliacrilamida con urea para identificar por isoelectroenfoque 14 especies de pescado, principalmente gádidos, salmónidos y túnidos, y cinco especies de camarón (*Penaeus* spp.) tanto crudos como tratados a 60°C y 85°C. El perfil específico de las proteínas extraídas con urea, resultó ser más apropiado para la diferenciación de las especies citadas que el obtenido con SDS. Rehbein y col. (1999a) observaron unas bandas intensas en la parte ácida del gel, que identificaron como parvoalbúminas, troponina C y las cadenas ligeras de la miosina. Las diferencias interespecíficas existentes en el valor del pI, permitieron identificar correctamente las especies de pescado estudiadas. Además, los perfiles proteicos obtenidos a partir de las muestras no tratadas por calor fueron similares a los de las calentadas a 85°C.

Estos mismos investigadores (Rehbein y col., 2000) estudiaron las parvoalbúminas como marcadores proteicos para la identificación de 9 especies de pescado (*Solea solea*, *Mullus surmuletus*, *Conger conger*, etc.) en muestras crudas y cocinadas a 70°C. Mediante la técnica de urea-isoelectroenfoque en geles comerciales de poliacrilamida con un intervalo de pI entre 4,96 y 5,64, los patrones obtenidos a partir de las parvoalbúminas purificadas permitieron diferenciar todas las especies analizadas.

En un estudio interlaboratorial, Mackie y col. (2000), compararon la eficacia de las técnicas de isoelectroenfoque nativa, IEF con urea y SDS-PAGE para identificar especies de pescado ahumadas y crudas (*Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, etc.), así como diferentes especies del género *Anguilla*. Los mejores resultados se obtuvieron con las técnicas de urea-isoelectroenfoque y SDS-PAGE, ya que los patrones obtenidos a partir de muestras crudas fueron muy similares a los obtenidos con muestras procesadas. Aunque, para diferenciar A.

australis de *A. anguilla* y *A. rostrata* en muestras sometidas a tratamiento térmico, la técnica de IEF nativa resultó ser la más adecuada.

En otro estudio similar, Etienne y col. (2001) trataron de identificar 6 especies de pescado en filetes reconstituidos a partir de músculo de pescado picado y en filetes sometidos a un tratamiento con altas presiones. Los resultados demostraron que en los filetes reconstituidos no se producía desnaturalización proteica, por lo que tanto la técnica de isoelectroenfoque nativa, como el IEF con urea y la SDS-PAGE eran técnicas adecuadas para identificar la especie de procedencia en estos productos. Sin embargo, el tratamiento con altas presiones desnaturaliza parcialmente las proteínas y solo resultaba posible identificar la especie empleando IEF con urea o SDS-PAGE.

Piñeiro y col. (2000), comprobaron que el isoelectroenfoque es una técnica especialmente adecuada para diferenciar especies de pescado muy relacionadas filogenéticamente, como 8 especies de la familia de los gádidos (*Merluccius merluccius*, *Merluccius australis*, *Gadus morhua*, etc.). Estudiaron proteínas musculares solubles en agua como la lactato deshidrogenasa (LDH), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G-3-PD), adenilato quinasa (ADK), malato deshidrogenasa (MDH), arginina quinasa (AK) y creatin quinasa (CK). Los resultados mostraron que los patrones de bandas obtenidos a partir de la tinción específica de la actividad de las enzimas la LDH y G-3-PD, seguida del análisis mediante isoelectroenfoque en geles comerciales, permitían identificar las ocho especies de pescados estudiadas.

Etienne y col. (2000), aplicaron también las técnicas de SDS-PAGE, isoelectroenfoque nativa y urea-isoelectroenfoque a la identificación de 3 especies de moluscos bivalvos: almeja fina (*Ruditapes decussatus*), berberecho (*Cerastoderma edule*) y almeja de Vietnam (*Meretrix lyrata*). Comprobaron que se obtenían perfiles electroforéticos más específicos con el análisis de proteínas procedentes del músculo aductor que con los extractos obtenidos a partir de manto y pie, tanto con la técnica de isoelectroenfoque como con la técnica de SDS-PAGE (Figura 12). Mediante la técnica de isoelectroenfoque sin urea desaparecían varias bandas con el tratamiento térmico de las proteínas, aunque los patrones obtenidos permitían la identificación de las tres especies estudiadas. La zona más óptima para la diferenciación se situó en un intervalo de pH entre 5,5 y 6,5, y el pI de las bandas más características se indica en la Figura 13. Sin embargo, con la técnica

de urea-isoelectroenfoque, tanto las muestras sin tratar como las sometidas a tratamiento térmico fueron prácticamente idénticas, y permitieron la identificación específica de la almeja fina, el berberecho y la almeja de Vietnam (*Figura 14*).

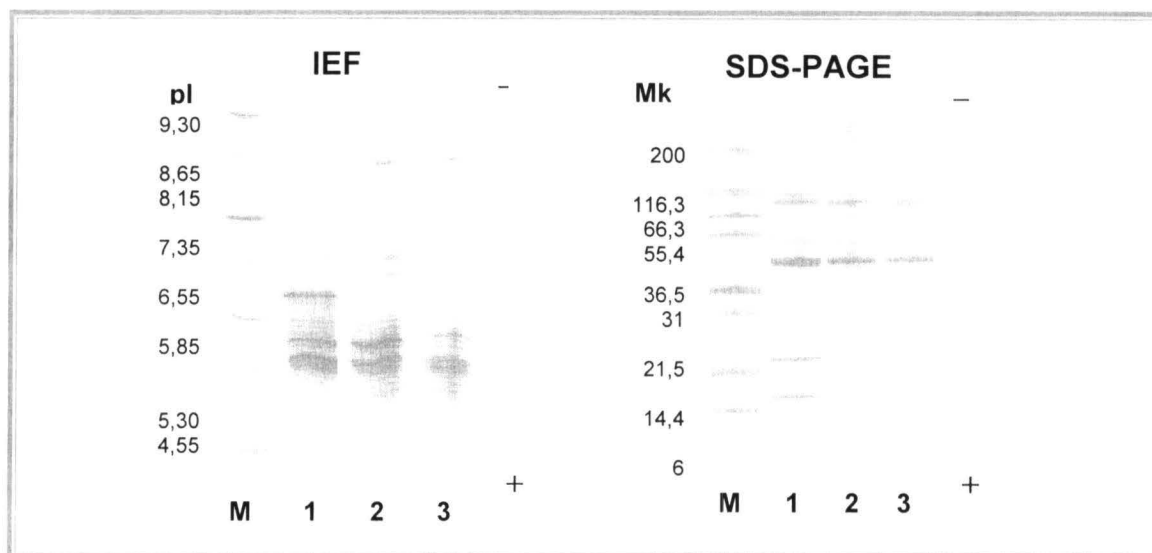


Figura 12. Perfil electroforético de la almeja fina (*R. decussatus*) obtenido a partir de músculo aductor (1), pie (2) y manto (3) mediante las técnicas de isoelectroenfoque (IEF) y SDS-PAGE. Mk= Patrón de peso molecular de proteínas (Etienne y col., 2000).

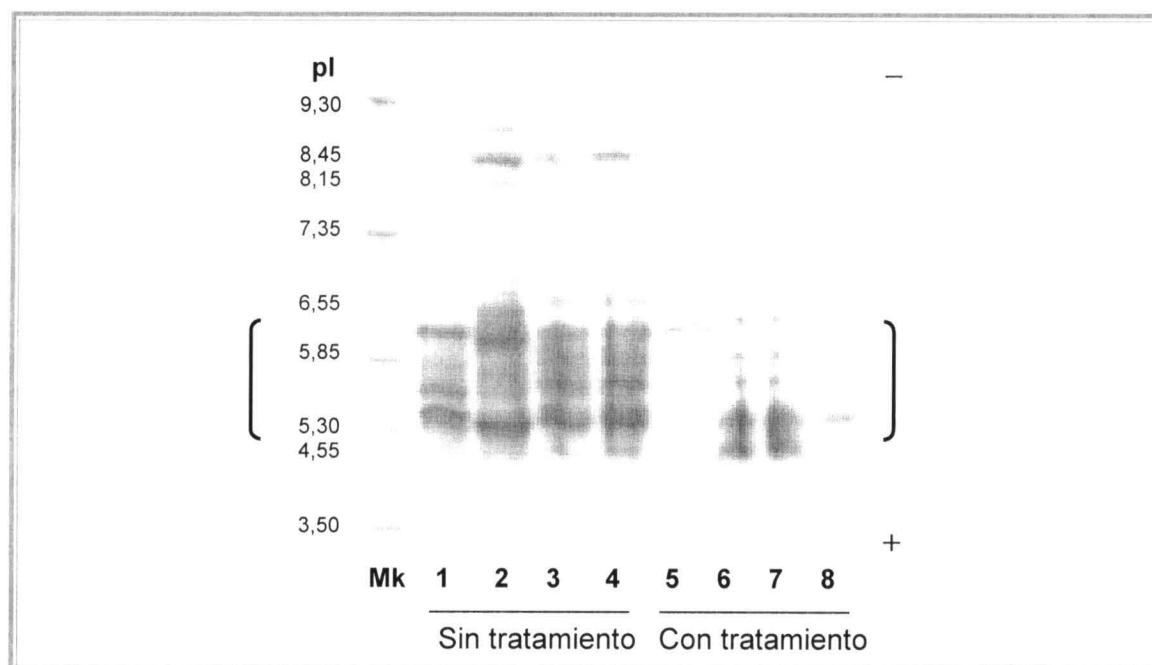


Figura 13. Perfiles electroforéticos obtenidos mediante la técnica de isoelectroenfoque a partir de almeja fina (1, 5), berberecho (2, 8) y almeja de Vietnam (3, 4 y 6, 7). Mk= Patrón de peso molecular de proteínas (Etienne y col., 2000).

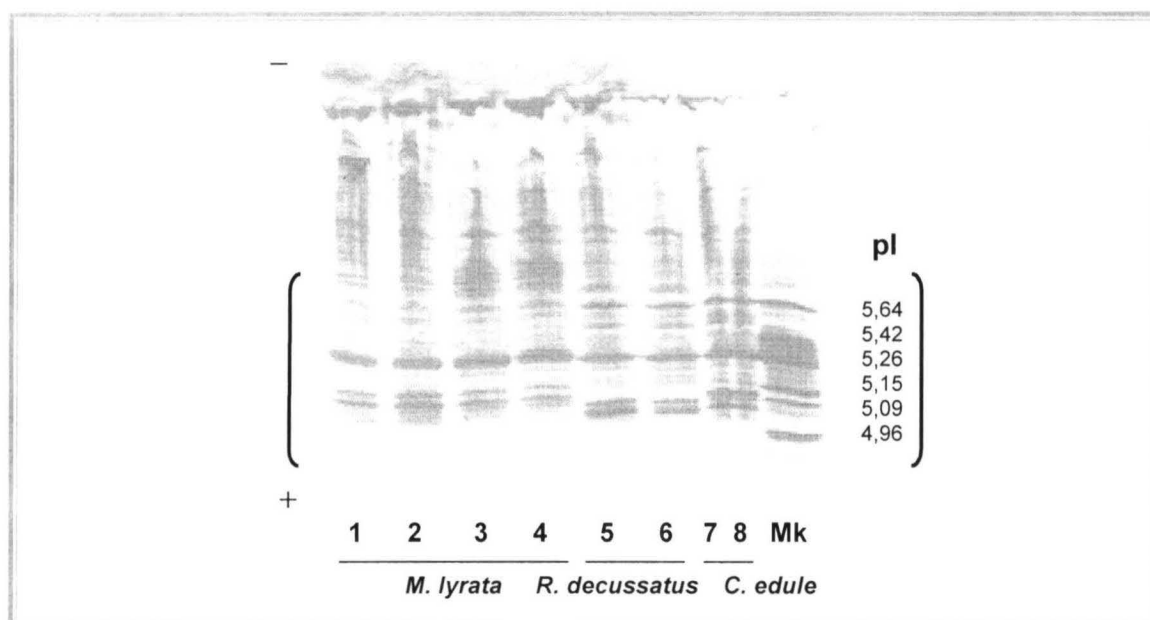


Figura 14. Perfiles electroforéticos de las proteínas solubles del músculo aductor, obtenidos mediante la técnica de urea-isoelectroenfoque a partir de almeja de Vietnam (1-4), almeja fina (5,6) y berberecho (7,8). Muestras crudas (3,4,6,8) y muestras tratadas con calor (1,2,5,7). Mk= Patrón de peso molecular de proteínas (Etienne y col., 2000).

En comparación con otras técnicas electroforéticas, el IEF presenta numerosas ventajas: (1) durante la electroforesis, las proteínas se localizan en zonas definidas, lo que mejora la resolución y la sensibilidad; (2) la técnica se puede modificar en muchos aspectos ajustándose a los requerimientos analíticos que se necesiten (Rehbein, 1990); (3) al final de la electroforesis el sistema está en equilibrio y por tanto, variaciones en los parámetros experimentales influyen menos en el patrón proteico obtenido, lo que permite utilizar fotografías o bases de datos para comparar los patrones de bandas de las muestras problema con muestras de referencia; y (4) la utilización de geles preparados comercialmente, principalmente los de poliacrilamida, acoplados a aparatos semiautomatizados como el Phastsystem™ (Penedo y col., 1992; Merchante y Ortín, 1993), permite incluso una mayor reproducibilidad de los resultados, así como una disminución en el tiempo requerido para cada análisis (Rehbein y col., 1995a).

No obstante, la técnica de IEF presenta algunos inconvenientes: (1) los perfiles proteicos obtenidos tienen un gran número de bandas y su interpretación

resulta, en algunos casos, complicada; (2) se trata de una técnica laboriosa que requiere personal especializado e instrumental adecuado; y (3) es una técnica cara, lo cual dificulta su implantación en laboratorios de análisis de alimentos.

II.4.1.1.3. Electroforesis capilar (EC)

La electroforesis capilar es una técnica electroforética que se ha aplicado recientemente a la identificación de especies. Aunque sus bases se establecieron en 1937, su uso no se generalizó hasta la comercialización reciente de equipos instrumentales adecuados (Wätzig y Dette, 1994). En los alimentos, prácticamente todos sus componentes, a excepción de los lípidos, se pueden analizar mediante electroforesis capilar (Cancalon, 1995a; 1995b). Esta técnica utiliza como soporte un capilar de sílice fundido de 50-250 μm de diámetro que se rellena con un tampón y se somete a un campo eléctrico de hasta 30 KV. Bajo estas condiciones, los cationes de la muestra migran hacia el cátodo en función de su relación carga/masa. Además, algunos de los grupos silanol de la superficie del capilar se encuentran ionizados y generan un flujo electroosmótico (EOF), es decir, un desplazamiento del tampón de relleno hacia el cátodo. Como resultado, se produce un pico de moléculas neutras que migran transportadas por el EOF, mientras que los aniones se mueven a una velocidad determinada por la diferencia entre el flujo electro-osmótico y su atracción anódica (Cancalon, 1995a).

La ventaja de este método con relación a otras técnicas de análisis, es que permite detectar y cuantificar simultáneamente diferentes moléculas. Esto se debe a que el equipo está dotado de un sistema que elimina el tampón de relleno de la columna y lo reemplaza por otro de forma automática, permitiendo así analizar los diferentes componentes de una muestra sin necesidad de incrementar el número de manipulaciones. Otras ventajas de la EC son la rapidez del análisis, que puede efectuarse en menos de 10 minutos, y los pequeños volúmenes requeridos tanto de muestra como de tampón. La EC permite un análisis completamente automatizado de proteínas. Esto supone una ventaja frente a los actuales métodos electroforéticos, que son laboriosos y requieren operarios especializados. Su principal limitación reside, sin embargo, en la puesta a punto de sistemas de detección adecuados para cada compuesto que además, han de ser muy sensibles debido a los pequeños volúmenes que se utilizan. En el caso de las proteínas, se utilizan normalmente sistemas de detección de ultravioleta (UV) (Cancalon, 1995b).

Existen distintos tipos de EC, pero la más utilizada es la electroforesis capilar de zona (ECZ), que utiliza reactivos de amplio intervalo de pH (desde ácidos hasta bases) para separar los distintos componentes en una muestra (Barnes, 1995). El análisis de las proteínas musculares sarcoplásmicas mediante ECZ, ha permitido la identificación de distintas especies de pescado, tanto frescas como congeladas. Sin embargo, para la identificación de especies de moluscos no se ha empleado esta técnica.

Leblanc y col. (1994), utilizaron la técnica de electroforesis capilar para identificar filetes frescos de 3 especies de bacalao (*Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* y *Ophiodon elongatus*) y abadejo del norte (*Pollachius virens*). Estos autores estudiaron también los cambios producidos en los perfiles electroforéticos tras el almacenamiento en congelación. El tiempo necesario para la separación de las proteínas fue de 9 minutos a un pH óptimo de 7,4 y utilizando un tampón de elevada fuerza iónica. A pesar de la congelación, los perfiles obtenidos seguían permitiendo la identificación de cada una de las especies.

Gallardo y col. (1995), emplearon la ECZ para la identificación de 8 especies de pescados planos. Los extractos acuosos de las distintas muestras, que contenían las proteínas sarcoplásmicas, se separaron bajo la acción de un campo eléctrico y se detectaron mediante luz UV en menos de 35 minutos. Los perfiles de las proteínas resultaron ser específicos de especie.

Chou y col. (1998), utilizaron los perfiles obtenidos mediante ECZ para la diferenciación de aleta de tiburón artificial y natural en productos sometidos a tratamiento térmico.

II.4.1.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Durante los últimos años se han publicado diversos trabajos que proponen la identificación de especies de pescado mediante el análisis cromatográfico de sus proteínas. La técnica más empleada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando columnas de fase reversa (RP-HPLC), la cual permite la separación de las proteínas atendiendo a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz (Sotelo y col., 1993). De este modo se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie, que permiten su identificación mediante

comparación con cromatogramas de referencia. En moluscos, esta técnica se ha empleado, por ejemplo, para la detección de diferentes toxinas presentes en los mismos (Chaidedgumjorn y col., 1999; Sun y col., 1999; Henry y col., 2000), pero no para la identificación de especies.

La técnica de RP-HPLC presenta ventajas importantes frente a las técnicas electroforéticas: (1) es una técnica rápida, sencilla y con gran poder de resolución; (2) no se utilizan reactivos tóxicos; y (3) gracias a la reproducibilidad de los resultados, una vez obtenidos los cromatogramas no es necesario el análisis conjunto de muestras de referencia (Osman y col., 1987). Cabe destacar que el uso de esta técnica podría ser especialmente interesante desde el punto de vista de la cuantificación, ya que los sistemas de detección, generalmente con UV, se podrían emplear para estimar la cantidad de proteína perteneciente a una especie presente en una mezcla (Sotelo y col., 1993).

Ashoor y Knox (1985), identificaron 7 especies de pescado de interés comercial (*Gadus morhua*, *Salmo salar*, etc.) mediante la técnica de HPLC. Osman y col. (1987), aplicaron esta técnica para identificar 31 especies de pescado crudo, congelado y tratado por calor, entre las que se encuentran la trucha arco iris, la carpa, la caballa, entre otros. Con las muestras de pescado crudo y congelado consiguieron perfiles cromatográficos específicos de especie. Pero con las muestras de pescado sometidas a diferentes tratamientos térmicos (100°C ó 121°C durante 5 o 15 minutos), los cromatogramas fueron significativamente diferentes de los de muestras de pescado fresco o congelado, por lo que esta técnica no resultó adecuada para la identificación de especies tratadas por calor.

Armstrong y col. (1992), utilizaron la técnica de HPLC para identificar 15 especies comunes en las aguas australianas (*Acanthopagrus australis*, *Zeus faber*, *Zenopsis nebulosus*, etc.). Los resultados obtenidos fueron aplicables para la identificación de muestras crudas y tratadas con radiaciones ionizantes. Estos autores obtuvieron cromatogramas específicos para cada una de las especies estudiadas y construyeron gráficos que permitían la comparación rápida de los cromatogramas de las muestras desconocidas y de las de referencia.

Piñeiro y col. (1997), aplicaron la técnica de RP-HPLC para identificar especies de pescado filogenéticamente cercanas, consiguiendo diferenciar 5

especies de gádidos (*Pollachius pollachius*, *Merluccius merluccius*, *Gadus morhua*, *Merlangius merlangus* y *Theragra chalcogramma*). Estos autores comprobaron que la técnica se podía aplicar para la identificación de dichas especies de pescados independientemente del tratamiento que hayan sufrido las proteínas durante el proceso de almacenamiento del pescado, ya que obtuvieron cromatogramas específicos tanto en muestras frescas como en congeladas.

Knuutinen y Harjula (1998), estudiaron mediante RP-HPLC las proteínas sarcoplásmicas de 16 especies de pescado. Los perfiles cromatográficos obtenidos fueron diferentes para la mayoría de las especies estudiadas. Comprobaron que los cromatogramas de las especies de salmónidos presentaron similitudes, mientras que los perfiles obtenidos con ciprínidos fueron muy distintos. Ross y col. (1998), aislaron los diferentes isotipos de las parvoalbúminas para la identificación de corvinata pintada (*Cynoscion nebulosus*) y una especie de palometa (*Trachinotus carolinus*). Comprobaron que las propiedades de estas proteínas eran adecuadas para la identificación de especies mediante HPLC empleando cromatografía de exclusión (SEC) e intercambio aniónico.

A pesar de los excelentes resultados obtenidos en la identificación de especies frescas y/o congeladas mediante HPLC, esta técnica presenta un grave inconveniente que impide su aplicación a la identificación de especies en muestras sometidas a tratamiento térmico: la falta de solubilidad de las proteínas en los tampones de elución, una vez desnaturalizadas por el calor. El desarrollo de nuevas metodologías que permitan la solubilización de las proteínas desnaturalizadas mediante la utilización de compuestos como el SDS, la urea o el mercaptoetanol, podría ampliar en gran medida el espectro de utilidad de esta técnica (Osman y col., 1987). Por lo tanto, por ahora su aplicación queda restringida a muestras frescas o congeladas.

II.4.1.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Las técnicas inmunológicas se basan en la visualización objetiva de la reacción que tiene lugar entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. Estas técnicas, cuya aplicación empezó en el campo clínico, se han empleado en el

análisis de los alimentos desde 1980 aproximadamente. Su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste las hacen especialmente útiles para el análisis de los alimentos (Samarajeewa y col., 1991).

La aplicación de estas técnicas para la identificación y cuantificación de especies animales en mezclas cárnicas y productos lácteos, así como para la detección de proteínas vegetales en alimentos de origen animal ha sido ampliamente estudiada (Hernández y col., 1994; García y col., 1994; Anguita y col., 1995; Dennis, 1996). Sin embargo, las aplicaciones para la identificación de especies de pescado y marisco han sido escasas. Esto puede deberse a que la obtención de anticuerpos específicos en el caso de los pescados y mariscos es más compleja, debido a la gran variedad de especies comercializadas y a las estrechas relaciones filogenéticas entre ellas (Sotelo y col., 1993).

Las técnicas inmunológicas se diferencian de otras técnicas analíticas en que la alta tecnología reside en las moléculas reactivas (anticuerpos) en lugar de en un soporte instrumental. Estas técnicas presentan importantes ventajas respecto a las electroforéticas y cromatográficas: (1) disminución de la cantidad de muestra necesaria; (2) reducción del tiempo y coste del análisis; (3) utilización de instrumental poco complejo; y (4) la posibilidad de semi-automatización y de aplicación en pruebas de campo y *kits* minituarizados.

Los métodos inmunológicos que se han empleado en la identificación de especies en productos marinos incluyen las técnicas de inmunodifusión en geles de agar, inmunolectroforesis y diversas técnicas inmunoenzimáticas.

II.4.1.3.1. Inmunodifusión en geles de agar

En esta técnica, el antígeno y el anticuerpo se introducen en unos pocillos cortados en un gel de agar y difunden el uno hacia el otro a través del gel. Si existe correspondencia entre ellos, forman complejos antígeno-anticuerpo que se visualizan como líneas blancas y opacas de precipitado (*Figura 15*).

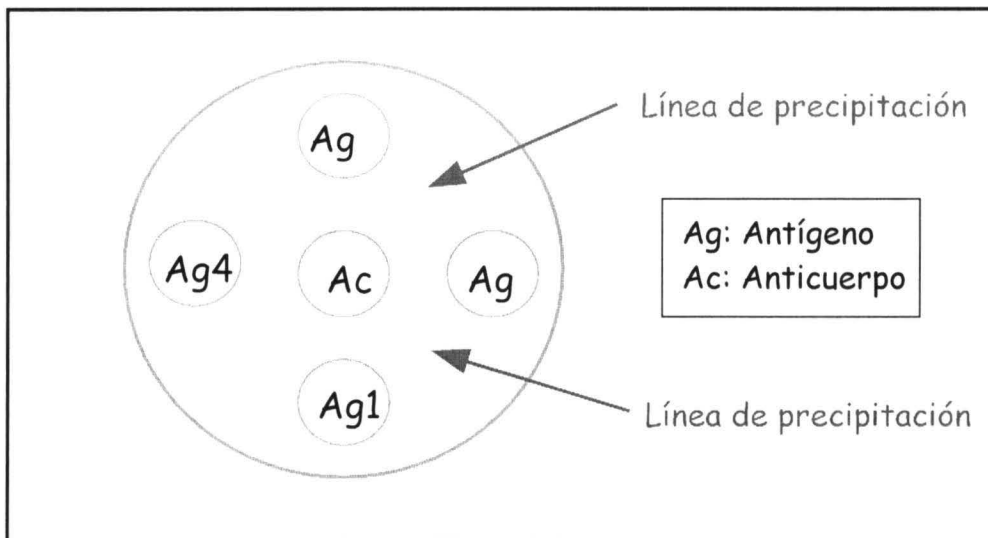


Figura 15. Técnica de inmunodifusión en geles de agar.

Viala y col. (1970), caracterizaron diversas enzimas fosfagen quinasa (arginina quinasa, lombricina, taurociamina, etc.) de invertebrados y vertebrados. Estudiaron la enzima arginina quinasa, que es característica de invertebrados y es monomérica en crustáceos y dimérica en algunas especies de moluscos. Estos autores, empleando las técnicas de inmunodifusión doble e inmunolectroforesis, no encontraron reactividad cruzada de dicha enzima entre crustáceos (como *Homarus vulgaris*) y numerosas especies de moluscos Lamelibranquios (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis*, *Pecten maximus*, etc.), Gastrópodos (*Patella vulgata*) y Cefalópodos (*Sepia officinalis*). Comprobaron que todas las enzimas fosfagen quinasa estudiadas fueron inhibidas por su antisuero específico de especie.

Watabe y col. (1988, 1990) comprobaron mediante la técnica de inmunodifusión que existía reactividad cruzada entre la paramiosina del molusco *Meretrix meretrix* y la misma proteína presente en las especies de moluscos *Homarus vulgaris* y *Holothuria leucospirata*.

Oberst y col. (1996), emplearon anticuerpos policlonales frente a parvoalbúminas de *Tilapia guineensis*, con el fin de diferenciar mediante inmunodifusión doble en geles de agar y otras técnicas inmunológicas, tres especies de *Tilapia* (*Tilapia guineensis*, *Tilapia dageti* y *Tilapia zilli*). Comprobaron

que el inmunosuero producía bandas de precipitación frente a los extractos proteicos de las tres especies, pero las bandas producidas se situaban en distintas posiciones según la especie de *Tilapia*, lo que indicaba que los anticuerpos reaccionaban con diferentes determinantes antigénicos en cada especie analizada.

Domínguez y col. (1997), utilizaron la inmunodifusión en geles de agar para identificar el lenguado (*Solea solea*) y fletán (*Hippoglossus hippoglossus*). Los anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización de conejos con proteínas solubles del fletán, presentaban reacciones cruzadas con el extracto proteico de lenguado. Para conseguir anticuerpos específicos de especie, los anticuerpos responsables de las reacciones cruzadas se eliminaron por inmunoadsorción con un polímero insoluble de proteínas de lenguado. La inmunoadsorción consiguió reducir las reacciones cruzadas, pero también disminuyó el título del suero. Estos autores también emplearon la técnica de inmunodifusión para diferenciar filetes ahumados de bacalao (*Gadus morhua*) y anguila (*Anguilla anguilla*), pero no consiguieron diferenciar dichas especies debido a la pérdida de antigenicidad por la desnaturalización proteica sufrida durante el ahumado.

Dreyfuss y col. (1997), desarrollaron una prueba de campo (TRIPS) basada en la inmunodifusión en geles de agar, que permite detectar surimi (elaborado a partir de 14 especies de pescado diferentes) en distintos productos pesqueros y cárnicos. En esta técnica, los reactivos se inmovilizan en discos de papel de filtro, de modo que todos los componentes de la reacción (placas de agar, plantilla, discos de inmunosuero y de referencia) se pueden suministrar en forma de kit, siendo la realización de la prueba e interpretación de los resultados muy sencilla.

II.4.1.3.2. Inmunoelectroforesis

Esta técnica consiste en separar electroforéticamente en un gel de agarosa o de acrilamida las proteínas presentes en una mezcla compleja. A continuación, se corta longitudinalmente en el gel un canal donde se incorpora el anticuerpo. La difusión del antígeno y el anticuerpo da lugar a la formación de tantos arcos de precipitación como reacciones antígeno-anticuerpo distintas se produzcan (*Figura 16*).

Oberst y col. (1996), desarrollaron esta técnica para diferenciar tres especies del género *Tilapia* (*T. guineensis*, *T. dageti* y *T. zilli*). Los resultados obtenidos por

inmunolectroforesis fueron similares a los descritos en la técnica de inmunodifusión doble, dando lugar a bandas específicas para cada especie analizada.

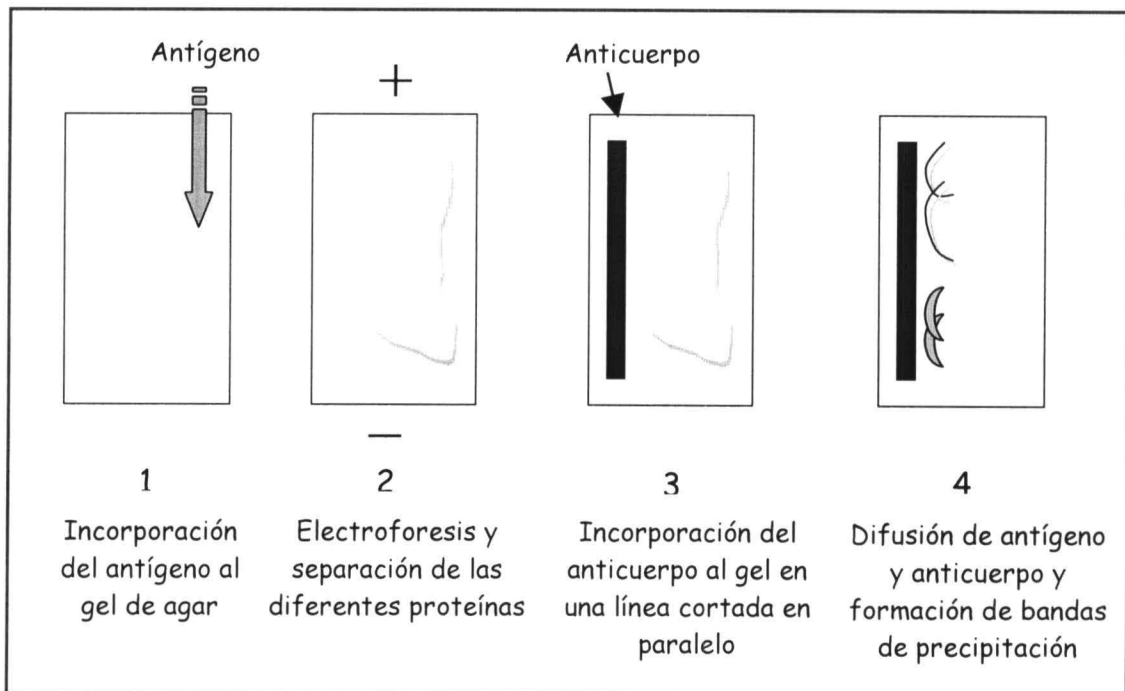


Figura 16. Técnica de inmunolectroforesis.

II.4.1.3.3. Técnicas Inmunoenzimáticas (ELISA)

Las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que constituyen actualmente las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas, se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo.

En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado (Clark y Engvall, 1980). En algunos formatos, como fase sólida se utilizan membranas, generalmente de nitrocelulosa, a las que se unen las proteínas mediante enlaces hidrofóbicos. Este último ensayo se denomina *Immunodotting*. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por una enzima (conjugada al anticuerpo o al antígeno) al degradar un sustrato adecuado. La medida de la

absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA, permite cuantificar la reacción inmunológica. Esto supone una importante ventaja frente a la inmunodifusión y a la inmunolectroforesis, que son técnicas cualitativas.

Las técnicas de conjugación para marcar los antígenos y los anticuerpos con una enzima deben permitir mantener la actividad tanto de la enzima como del anticuerpo o antígeno conjugados. La enzima utilizada en la conjugación es conveniente que esté purificada, sea activa, fácil de obtener y que al reaccionar con el sustrato origine un producto fácilmente observable y cuantificable. Las enzimas más utilizadas con este fin son la peroxidasa de rábano, la β -galactosidasa, la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina (Voller y col., 1986).

La elección del sustrato enzimático es también importante en las metodologías ELISA. El sustrato debe ser estable y soluble, antes y después de su degradación. La enzima peroxidasa de rábano, una de las más empleadas, utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno y como donantes de hidrógeno la ortofenildiamina (OPD), el ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina)-sulfónico (ABTS), el ácido 5-aminosalicílico y la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). En el caso de la β -galactosidasa, el sustrato más utilizado es el orto-nitrofenil- β -galactopiranosido (O-NPG) y para la fosfatasa alcalina el para-nitrofenilo (P-NPP) (Tyssen, 1985). Los compuestos donantes de hidrógeno, al oxidarse en presencia del sustrato, originan compuestos coloreados cuantificables espectrofotométricamente.

Hay diversos factores que determinan el formato de ELISA más apropiado para el desarrollo de una aplicación específica. Estos incluyen: (1) la muestra objeto de análisis (tipo y cantidad); (2) el tiempo disponible para efectuar cada determinación; (3) el grado de exactitud requerido; y (4) los medios materiales y humanos disponibles (infraestructura, equipos de análisis y especialización de los técnicos).

Los formatos de ELISA pueden ser competitivos, cuando se utilizan cantidades limitadas de antígeno o anticuerpo, o no competitivos, cuando los anticuerpos o los antígenos se incorporan en exceso (Gosling, 1990). En la identificación de especies de pescado y marisco se han empleado principalmente los formatos de ELISA indirecto e *Immunodotting*, si bien los más utilizados en la

identificación de especies de carne son el ELISA indirecto, el ELISA competitivo y el ELISA *sandwich* (Patterson y Jones, 1990). Sin embargo, las técnicas inmunológicas apenas se han utilizado para la identificación de especies de moluscos en alimentos; aunque existen algunas referencias de su utilización en la identificación de moluscos en el mar y el plancton (Demers y col., 1993; Paugam y col., 2000).

ELISA indirecto

En esta técnica, el antígeno se adsorbe en primer lugar a una fase sólida. A continuación se añade el anticuerpo, que se une al determinante antigénico del antígeno inmovilizado. Este anticuerpo puede estar directamente conjugado a una enzima o bien se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima que reconoce como antígeno al anterior. Finalmente, se añade el sustrato específico de la enzima. La degradación del sustrato por la enzima produce una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría (*Figura 17*).

“Immunodotting”

La técnica de *immunodotting* es una técnica inmunoenzimática cualitativa que utiliza como soporte una membrana, generalmente de nitrocelulosa. Los extractos antigénicos que se desean analizar se depositan en la membrana en forma de gota, tras un período de incubación y lavado para eliminar el exceso de antígeno, se añade el suero específico. A continuación, se lava la membrana para eliminar los anticuerpos no unidos a los antígenos y se incorpora un segundo anticuerpo que reconoce como antígeno al anterior y que está conjugado con una enzima. Cuando se añade el sustrato, que en este caso debe producir un precipitado de color al ser degradado por la enzima, se aprecia una mancha coloreada en los lugares en los que se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo (*Figura 18*).

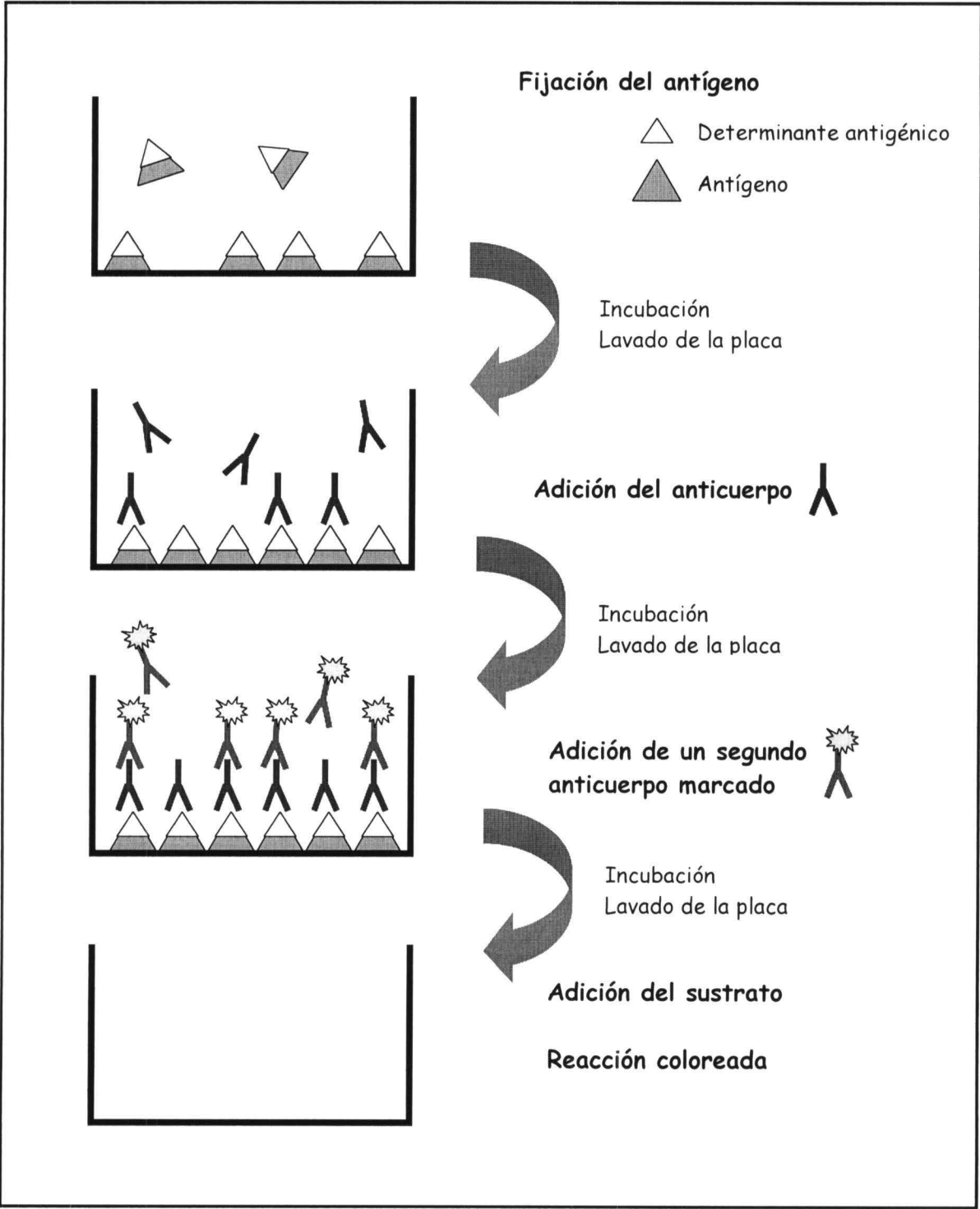


Figura 17. Técnica de ELISA indirecto.

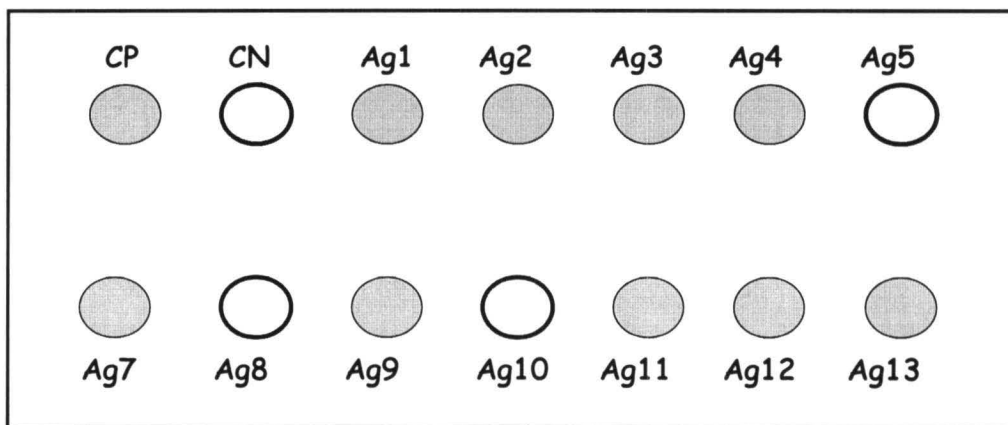


Figura 18. Técnica de *Immunodotting*. CP= Control positivo; CN= Control negativo; Ag= antígeno. Las manchas de color marrón corresponden a las muestras que contienen el antígeno que se pretende identificar.

An y col. (1990), obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a una proteína termoestable específica del langostino de roca (*Sicyonia brevirostris*) denominada proteína M, que previamente habían separado mediante SDS-PAGE. Utilizando estos anticuerpos y las técnicas de ELISA indirecto e *immunodotting* diferenciaron el langostino de roca de otros 23 productos entre los que se incluían carnes, pescados y mariscos frescos y desnaturalizados por calor. La técnica de ELISA desarrollada permitió detectar hasta 4,3 ng de las proteínas del langostino de roca en mezclas de productos marinos y cárnicos.

Verrez y col. (1992), emplearon las técnicas de ELISA e *immunodotting* para detectar la presencia de tejidos de invertebrados en surimi. Estos investigadores emplearon anticuerpos policlonales frente a tres proteínas específicas de invertebrados: paramiosina (proteína miofibrilar), hemocianina (pigmento respiratorio de la hemolinfa de la mayoría de los artrópodos y moluscos), y arginina quinasa (enzima citoplásmica). Los anticuerpos obtenidos frente a la hemocianina del cangrejo *Limulus polyphemus* no fueron adecuados para la detección de cangrejo en surimi. Sin embargo, los anticuerpos policlonales obtenidos frente a la arginina quinasa de langosta, *Homarus vulgaris*, resultaron ser adecuados para detectar la presencia de crustáceos en surimi. Además, los anticuerpos desarrollados frente a la paramiosina de la lapa *Patella vulgata* permitieron detectar

la adición de especies de moluscos en productos tipo surimi. Posteriormente, Verrez-Bagnis y Escriche-Roberto (1993), utilizaron estas dos técnicas inmunoenzimáticas para detectar carne de cangrejo (*Chionoecetes opilio*) en derivados del surimi. Para ello emplearon los anticuerpos policlonales obtenidos frente a la arginina quinasa de la langosta. Estos anticuerpos reconocían a las muestras de carne de cangrejo, aunque dieron una respuesta muy débil frente a los extractos de moluscos analizados (vieira, *Pecten maximus*; calamar, *Omastrephes sagittatus* y lapa, *Patella vulgata*). Al analizar muestras de surimi que no contenían cangrejo, obtuvieron resultados negativos, mientras que en preparaciones de surimi suplementadas con carne de cangrejo existía una correlación entre la cantidad de cangrejo añadido y el nivel de respuesta inmunológica obtenido. La sensibilidad de las técnicas inmunológicas desarrolladas en este trabajo, permitía detectar de 10-25g de carne de cangrejo por kilogramo de producto, incluso después de un proceso de esterilización térmica.

Huang y col. (1995), obtuvieron dos anticuerpos monoclonales frente a la proteína α de *Lutjanus campechanus*. El anticuerpo C1C1 mostró reacciones cruzadas con otras especies del género *Lutjanus* pero no frente a otros géneros, por lo que se utilizó para desarrollar técnicas de ELISA e *immunodotting* para diferenciar este género de otras 36 especies de peces y animales de abasto. El otro anticuerpo monoclonal, C2A2, no presentó reactividad cruzada con el resto de las especies de *Lutjanus* y se utilizó para diferenciar *Lutjanus campechanus* de las otras cuatro especies del género analizadas.

Shepard y Hartmann (1996), desarrollaron anticuerpos monoclonales frente a la seroalbúmina para la identificación de la especie de pescado *Istiophorus albicans*. Utilizaron un formato de ELISA *sandwich* sobre un soporte de bolas de vidrio, empleando para ello el anticuerpo monoclonal M2D1 y anticuerpos policlonales frente a la albúmina sérica de dicha especie. El test se utilizó para analizar muestras de riñón, músculo blanco, músculo rojo y corazón. Además, con este formato de bolas de vidrio tapizadas con el anticuerpo monoclonal M2D1, se pudieron examinar 18 muestras en menos de una hora.

Otros autores han conseguido identificar diversas especies de pescado empleando anticuerpos policlonales producidos frente a extractos solubles de proteínas musculares, en estado nativo o sometidas a distintos tratamientos

tecnológicos. Taylor y Jones (1992a), pusieron a punto una técnica de ELISA indirecto para identificar sardina (*Sardina pilchardus*) en productos enlatados. Carrera y col. (1996, 1997) diseñaron técnicas de ELISA indirecto y ELISA en paletas para la identificación de salmón (*Salmo salar*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y palometa (*Brama raii*) ahumadas. Del mismo modo, Céspedes y col. (1999c) identificaron mediante ELISA indirecto en placas de poliestireno o en paletas, 4 especies de pescados planos: lenguado (*Solea solea*), solla (*Pleuronectes platessa*), platija (*Platichthys flesus*), y fletán (*Reinhardtius hippoglossoides*).

El principal inconveniente del empleo de anticuerpos policlonales producidos frente a extractos musculares solubles, reside en que en ocasiones son poco específicos y, además de reconocer a la especie frente a la cual se han producido, reconocen también a otras. En la actualidad existen varias técnicas que permiten mejorar la especificidad de los anticuerpos, siendo la más utilizada la técnica de inmunoadsorción (Carrera y col., 1996). Por ejemplo, Taylor y col. (1994a) trataron de identificar mediante técnicas de ELISA indirecto y competitivo varias especies de pescado en productos enlatados. Obtuvieron anticuerpos policlonales frente a extractos de proteínas solubles de sardinas (*Clupea pilchardus*) enlatadas, para diferenciarlas de otras especies como el arenque (*Clupea harengus*) o la caballa (*Scomber scombrus*). Comprobaron que mediante inmunoadsorción de los anticuerpos con los extractos antigénicos de las especies de interés, reducían considerablemente las reacciones cruzadas de los inmunoseros con otras especies. No obstante, estos autores no consiguieron diferenciar el bonito de varias especies de túnidos, debido a que las reacciones cruzadas de los inmunoseros obtenidos eran demasiado intensas y no se eliminaban por inmunoadsorción.

Finalmente, otra alternativa para la obtención de anticuerpos específicos de especie sería la inmunización de animales de experimentación con péptidos sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica de la proteína nativa. Estos anticuerpos antipectídicos con frecuencia reconocen a la proteína nativa de la que derivan (Dyson y Wright, 1995), y son altamente específicos. Su especificidad puede considerarse como “predeterminada”, es decir, permite conocer con antelación la región de la proteína nativa frente a la que se obtendrán anticuerpos.

Diversos parámetros, como el tamaño, la hidrofiliidad, movilidad, accesibilidad de la región, etc., analizados conjuntamente mediante determinados algoritmos, permiten predecir la antigenicidad de un fragmento peptídico determinado (Van Regenmortel y col., 1988). Actualmente, se emplea el análisis de estos índices para el diseño de péptidos sintéticos a partir de la secuencia aminoacídica de una proteína. Aunque la obtención de anticuerpos anti-peptídicos no se ha aplicado a la identificación de especies de pescado y marisco, existen en la bibliografía trabajos sobre la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a bacteriocinas (Martínez y col., 1997), cuya naturaleza es peptídica.

II.4.2. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Durante las dos últimas décadas, se han experimentado grandes avances en las técnicas de biología molecular que han determinado la identificación de marcadores genéticos que permiten estudiar la evolución y las migraciones de determinadas especies marinas. El diseño de marcadores genéticos se ha basado en el análisis del ADN, primero en el mitocondrial y después en el nuclear. Es precisamente el ADN mitocondrial (ADNmt), gracias a determinadas características que le diferencian del nuclear, el más utilizado en la identificación de especies. No obstante, el estudio de ADN nuclear (ADNn) ha adquirido en los últimos años una gran importancia (Ferguson y col., 1995). Todo ello ha permitido el desarrollo de un gran número de técnicas genéticas para la diferenciación de especies, tanto de pescado y marisco, como de plantas y animales (Meyer y Candrian, 1996). Los métodos genéticos de identificación de especies, a pesar de ser más caros que los métodos de análisis de proteínas y exigir un mayor soporte técnico, presentan importantes ventajas con respecto a estos últimos, tal y como se recoge en la *Tabla 17*.

La información genética disponible sobre los organismos acuáticos es menor que la contenida en las bases de datos sobre el hombre y otros animales superiores, pero aumenta con rapidez. En los últimos años se han desarrollado diversos métodos genéticos para la identificación de especies de pescado en productos frescos, congelados e incluso conservas sometidas a procesos de esterilización comercial (Bossier, 1999; Carrera y col., 1998, 2000; Quinteiro y col., 1998; Céspedes y col., 1999a, 1999b, 2000).

Tabla 17. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para la identificación de especies de pescado y marisco.

Métodos basados en el análisis de proteínas

Ventajas

- ✓ Rapidez en el análisis de las muestras
- ✓ Menor coste de los reactivos
- ✓ Técnicas más sencillas de aprender
- ✓ Amplia disponibilidad de datos para muchas especies
- ✓ Técnicas en general más baratas

Inconvenientes

- ✓ En ocasiones es imposible analizar muestras sometidas a procesos intensos o a tratamientos de esterilización
- ✓ La conservación de las muestras ha de hacerse en buenas condiciones para obtener resultados reproducibles
- ✓ Se requiere gran cantidad de muestra
- ✓ El análisis de los perfiles obtenidos es bastante complejo
- ✓ Las proteínas varían (en cantidad y tipo) dependiendo del tejido que se examine

Métodos genéticos

Ventajas

- ✓ Se necesita muy poca cantidad de muestra
- ✓ Se pueden analizar muestras conservadas en malas condiciones durante mucho tiempo
- ✓ Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesos, e incluso esterilizadas
- ✓ Se pueden detectar mutaciones silentes (imposibles de detectar mediante análisis de proteínas)
- ✓ El ADN es el mismo en todos los tipos celulares de un organismo

Inconvenientes

- ✓ El análisis es relativamente caro
- ✓ Técnicas más complejas, que necesitan por tanto de personal más especializado
- ✓ Existe menos información disponible

Sin embargo, la aplicación de estas técnicas a la identificación de especies de moluscos ha sido escasa y su objetivo ha consistido principalmente en el análisis genético de poblaciones y el estudio de relaciones filogenéticas entre especies, más que la diferenciación de especies de interés comercial (Martínez-Lage y col., 1995; Heath y col., 1995).

Características del genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial de los metazoos consiste en una molécula de ADN pequeña, de doble cadena y circular (excepto en *Hydra* y en *Paramecium* que es lineal) de la que se encuentran múltiples copias en cada mitocondria. Dependiendo del tipo de célula se pueden encontrar incluso mil copias. El tamaño del genoma mitocondrial de los metazoos se estima en unos 14-40 Kilobases (Snyder y col., 1987), aunque existen variaciones tanto intraespecíficas como interespecíficas (Awise y col., 1987; Moritz y col., 1987).

El ADN mitocondrial presenta varias diferencias con respecto al ADN nuclear que resultan interesantes para el estudio de la evolución de las especies. Algunas de sus características más relevantes son:

- Se trata de un ADN haploide y no recombinante (Horak y col., 1974). Se hereda casi exclusivamente por vía materna, salvo en alguna excepción como ocurre con el mejillón *Mytilus* spp., en el que se ha demostrado que puede ser también paterna (Zourus y col., 1992; Saavedra y col., 1997).
- No contiene intrones, raramente aparecen secuencias duplicadas y no hay apenas espacios intergénicos. Es mucho más pequeño que el ADNn (aproximadamente cinco órdenes de magnitud).
- Cada célula contiene muchas copias del ADNmt (frente a una o dos copias del ADNn).
- Tiene una tasa de evolución 5-10 veces mayor que el ADNn, debido a una mayor frecuencia tanto de mutaciones puntuales como de inserciones y delecciones (Brown y col., 1979).

El ADN mitocondrial de los metazoos comprende 12 ó 13 genes que codifican proteínas, 2 genes que codifican ARNs ribosómicos (ARNr 12S y ARNr 16S), 22 genes que codifican ARNs de transferencia (ARNt) y por lo menos una

región no codificante, denominada *región control* en los vertebrados (Clayton, 1982; 1984), que contiene los sitios de iniciación para la replicación y la transcripción del ARN. Los genes mitocondriales codifican distintas subunidades de enzimas que intervienen en la cadena transportadora de electrones: siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6), el citocromo b, tres subunidades de la citocromo c oxidasa (CO I, II y III) y una o dos subunidades de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y en ocasiones también la 8).

No obstante, se requieren muchas más proteínas para el funcionamiento correcto de la maquinaria bioquímica de la mitocondria, pero éstas son importadas desde el citoplasma celular. Aparentemente, el genoma mitocondrial actual es el resultado de una simplificación del ADN mitocondrial primitivo, más complejo, a partir del cual se ha producido una transferencia progresiva de genes al núcleo celular.

Por el momento sólo se ha secuenciado el ADN mitocondrial completo en un número reducido de animales. De ellos, el genoma mitocondrial de mayor tamaño que se ha encontrado es el de la vieira, *Pecten maximus* (> 39,3 Kpb) que además presenta gran variedad intraespecífica. La organización y secuencia completa del genoma mitocondrial se ha determinado en 6 especies de moluscos, que representan 3 clases diferentes dentro del filo Moluscos, como son la especie de mejillón *Mytilus edulis*, de la clase Bivalvos (Hoffmann y col., 1992); el chitón negro *Katharina tunicata*, de la clase Poliplacóforos (Boore y Brown, 1994); y el molusco *Pupa strigosa* (Kurabayashi y Ueshima, 2000) y tres especies de caracoles: *Albinaria coerulea* (Hatzoglou y col., 1995), *Cepaea nemoralis* (Terrett y col., 1996) y *Euhadra herklotsi* (Yamazaki y col., 1997) de la clase Gastrópodos.

Cabe destacar que el ADNmt del género *Mytilus* carece de la subunidad ATPasa 8 (Figura 19), y tanto el ADN mitocondrial de *Mytilus* como de *Katharina* tienen varios genes ARNt además de los 22 genes que codifican ARNs de transferencia (Kurabayashi y Ueshima, 2000).

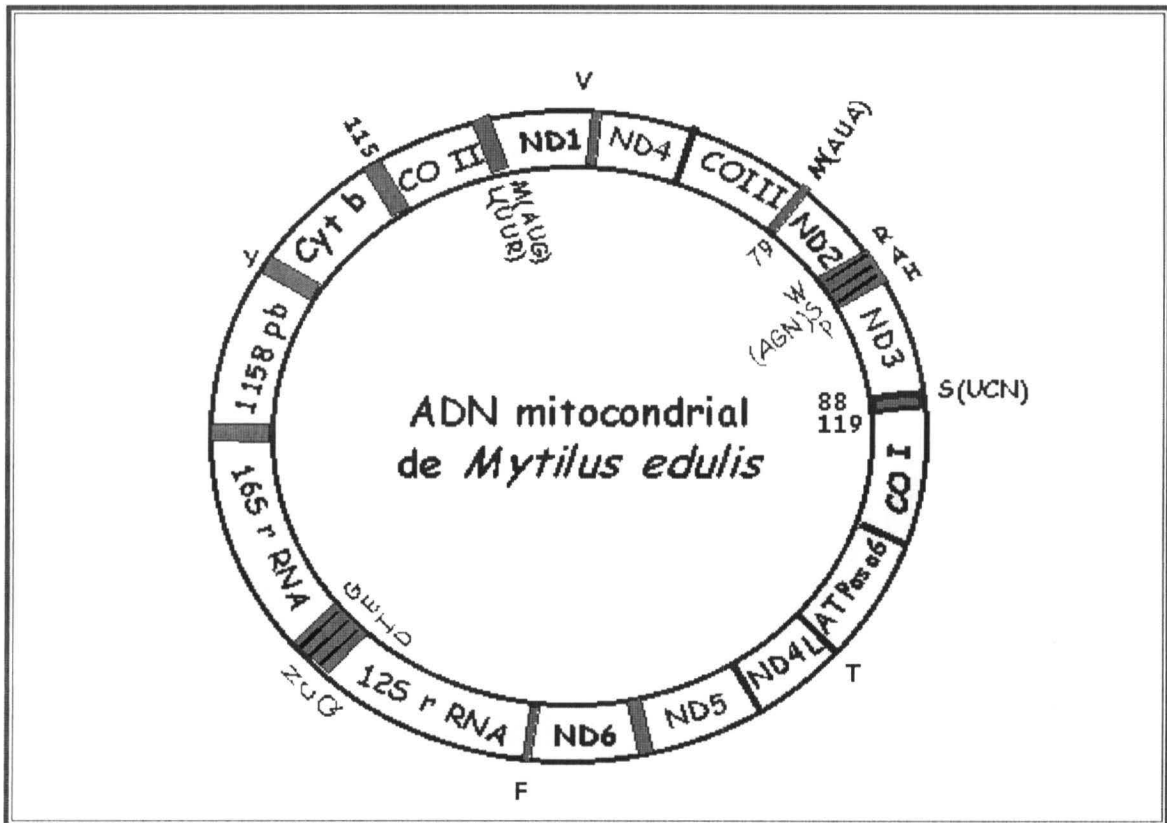


Figura 19. ADN mitocondrial del molusco *Mytilus edulis*. Los genes que codifican ARN de transferencia (ARNt) se indican con la letra que corresponde a su código aminoacídico. Los genes ARNt para la Leucina, Metionina y Serina se muestran con el triplete que reconocen. Los números indican los nucleótidos que contienen 5 regiones intergénicas. La dirección de la transcripción es de izquierda a derecha en todos los genes.

Las dos cadenas del genoma mitocondrial se denominan “L” (ligera) y “H” (pesada). Su denominación se debe a las marcadas diferencias existentes en las dos hebras en el contenido de G (guanina) + T (timina), lo cual determina un comportamiento diferente de ambas cadenas en los gradientes de CsCl_2 . En general, la terminación de los codones de la cadena pesada del ADNmt de los metazoos suele ser en T ó G, mientras que los de la cadena ligera suelen ser en A (adenina) ó C (citosina) (Asakawa y col., 1991). Sin embargo, la cadena ligera y pesada del genoma mitocondrial del molusco gastrópodo *Pupa strigosa* presenta codones de terminación con similar frecuencia para T ó G que para A ó C (Kurabayashi y Ueshima, 2000).

Inicialmente se pensó que el ADNmt era una molécula muy conservada ya que codifica proteínas que desempeñan funciones cruciales en el metabolismo celular. Sin embargo, se ha comprobado que la tasa de evolución del ADNmt es mucho más rápida que la del ADNn. No obstante, no todos los genes mitocondriales acumulan mutaciones con la misma velocidad. La región control, especialmente la zona denominada D-loop, es la zona con mayor tasa de evolución. Esta mayor tasa se debe sobre todo a sustituciones, adiciones y deleciones, siendo la zona responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial (Brown, 1985; Harrison, 1989). Los genes que codifican proteínas evolucionan más lentamente que aquellos que codifican ARNt y ARNr. Aunque cada gen tiene su propia tasa de evolución, los genes que codifican las subunidades COI, II, III y el citocromo *b* son más conservados que los que codifican las distintas subunidades ND y la ATPasa. En los genes que codifican proteínas se producen sustituciones principalmente en la tercera posición de los codones, y las transiciones (cambios de una purina por otra o de una pirimidina por otra) son mucho más frecuentes que las transversiones (cambios de una purina por pirimidina o viceversa).

El orden de los genes mitocondriales suele variar muy poco entre los vertebrados, aunque no ocurre así con el filo Moluscos. El genoma mitocondrial de las tres clases de moluscos citadas anteriormente es muy diferente (Yamazaki y col., 1997). Wilding y col. (1999), determinaron parcialmente la secuencia del molusco gástrópodo *Littorina saxatilis*, y demostraron que la organización de los genes del ADNmt era muy variable, no sólo entre las diferentes clases de moluscos sino también dentro de la clase Gástrópodos. Las diferencias más comunes se deben a transposiciones de los genes que codifican los ARNt. La distribución de los genes ARNt entre los genes que codifican proteínas sugiere que su estructura secundaria actúa como si fueran signos de puntuación durante la transcripción. De hecho, cuando dos genes que codifican proteínas son contiguos y no separados por ARNt, en la zona de unión de ambos genes existe una región que puede formar una estructura secundaria estable de horquilla, similar a la estructura secundaria de bucles que posee el ARNt (Thomas y Beckenbach, 1989).

Conviene señalar que el código genético mitocondrial, además de no ser idéntico en todas las especies, es más degenerado que el código genético

universal del núcleo de las células eucariotas. Las diferencias más notables entre los códigos genéticos mitocondrial y nuclear, incluyen la utilización del codón TGA como triptófano en lugar de ser codón de terminación (tanto en *Mytilus* como en *Drosophila*), la utilización de ATA como metionina en lugar de isoleucina y el empleo de los tripletes AGA y AGG como serina en lugar de ser codones de terminación como pasa en el ADNmt de los vertebrados (Bibb y col., 1981). Además, la especie de mejillón *Mytilus edulis* se caracteriza por tener una característica única dentro del ADNmt de los animales, ya que posee un gen adicional ARNt que emplea el anticodon TAT para la metionina. También es frecuente que algunos genes mitocondriales carezcan de un codón de terminación completo (por ejemplo, TAA o TAG) y terminen simplemente en T o en TA, como ocurre en el molusco *Pupa strigosa* (Kurabayashi y Ueshima, 2000).

Métodos para el análisis del ADN

Se pueden diferenciar tres estrategias principales para la caracterización e identificación del ADN. Una de ellas es la *hibridación del ADN* aislado con sondas de ADN que incluyen secuencias diana específicas de la especie objeto de estudio. Además, el ADN también se puede caracterizar mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), y finalmente, otra posibilidad es el empleo de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis y col., 1986), gracias a la cual se han identificado un gran número de especies de productos marinos. Los métodos de amplificación enzimáticos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), están basados también en la hibridación de ADN con sondas específicas, aunque en este caso se utiliza más de una sonda, lo cual permite mejorar la especificidad y sensibilidad de los ensayos.

Cuando se analizan los fragmentos de ADN, amplificados o no, se puede complementar la información con la secuenciación de la cadena de nucleótidos y su comparación con las secuencias que se encuentran en las bases de datos disponibles. De este modo, se puede comprobar la identidad de las secuencias objeto de estudio, aunque este método es caro y laborioso. Para ello se suelen utilizar genes que codifican proteínas, teniendo en cuenta que sólo un 1% del genoma de los mamíferos cumple este requisito.

Sin embargo, también se pueden analizar regiones del ADN que no codifican proteínas, como la identificación de elementos repetitivos específicos o el estudio del polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD), que están adquiriendo una gran importancia en los últimos años (O'Reilly y Wrigth, 1995; Goodier y Davidson, 1998; Koh y col., 1998; Martínez y Malmheden Yman, 1999).

II.4.2.1. ESTUDIOS DE HIBRIDACIÓN

Las técnicas de hibridación del ADN se basan en que una secuencia de nucleótidos predeterminada se utiliza como sonda para encontrar la misma secuencia en muestras problema. Empleando esta estrategia se pueden detectar diferencias entre las secuencias de nucleótidos de varias especies.

Una sonda de ADN es una secuencia corta de nucleótidos que se une a regiones complementarias de un blanco o diana, permitiendo localizar una secuencia homóloga de ADN en una muestra compleja. La complementariedad entre los nucleótidos determina la hibridación de una sonda con su ADN específico. Por lo tanto, para diseñar una sonda de ADN es necesario identificar una secuencia específica de nucleótidos, aislarla, reproducirla y marcarla con un compuesto que permita determinar si ha tenido lugar la hibridación con el ADN diana (Tenover, 1988). Entre los marcadores más empleados están los radioisótopos ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I y ^{14}C , aunque cada vez se utilizan más los marcadores no radioactivos, entre los que destacan enzimas, como la peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina, compuestos fluorescentes, el complejo avidina-biotina o el hapteno digoxigenina (Dovey y Towner, 1989).

Las sondas génicas se pueden obtener por diversos procedimientos:

- Mediante síntesis química de los oligonucleótidos, para lo cual es necesario conocer la secuencia de nucleótidos del ADN del organismo a investigar.
- Mediante la extracción del ADN de las células y su posterior fragmentación con enzimas de restricción, para que al menos alguno de ellos contenga la secuencia de bases que le confiera especificidad.

A continuación, y con el fin de reproducir esa secuencia, se insertan los fragmentos en un vector plasmídico que favorezca la clonación y propagación. Posteriormente, se trata otra vez con endonucleasas y se separan los fragmentos mediante electroforesis. Después se marcan los fragmentos en un extremo

(marcaje terminal) o a lo largo de toda la cadena con la molécula elegida y por último la hibridación de la sonda marcada con un ADN problema se pone de manifiesto por auto-radiografía, colorimetría o detección de fluorescencia, dependiendo del compuesto que se haya empleado como marcaje (Leighton-Jones, 1991; Wolcott, 1991; Lockley y Bardsley, 2000).

Para la identificación de especies se pueden utilizar como sondas secuencias de nucleótidos específicas de especie. No obstante, lo más sencillo es utilizar como sonda ADN nuclear total de la especie de referencia, marcado con un compuesto adecuado (radioactivo o no). El ADN de las muestras problema, desnaturalizado por calor o por tratamiento alcalino, se fija a una membrana de nylon y se incuba con la sonda. La sonda marcada se unirá solamente al ADN de las muestras problema que reconozca como complementario. Esta técnica, se denomina *dot blot* (Figura 20), y se ha empleado para la identificación de carne de vacuno (Winterø y col., 1990), cerdo (Ebbehøj y Thomsen, 1991), oveja (Chikuni y col., 1990), cabra (Buntjer y col., 1995), pollo (Buntjer y col., 1999), pavo (Buntjer y col., 1995), conejo (Hunt y col., 1997), ciervo (Buntjer y col., 1995) y caballo (Hunt y col., 1997), tanto en muestras crudas como sometidas a tratamiento térmico. Sin embargo, la presencia de reacciones cruzadas (por ejemplo entre los rumiantes), limita la aplicación de esta técnica. Cuando no se producen reacciones cruzadas, los límites de detección pueden llegar al 0,1% de la especie analizada en mezclas con otras especies, aunque por lo general no es posible la cuantificación. Una de las ventajas de esta técnica es que es muy sencilla y no requiere el conocimiento de ninguna secuencia en particular de la especie analizada.

Otra de las técnicas de hibridación con sondas de ADN que se ha empleado en la diferenciación de especies y para estudios filogenéticos y de poblaciones es la denominada *southern blot*. Esta técnica se aplica al estudio tanto del ADN mitocondrial como del nuclear y comprende varias etapas. En primer lugar se aísla el ADN de la muestra y se fragmenta utilizando enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN obtenidos se separan electroforéticamente en geles de agarosa y a continuación se transfieren a una membrana de nylon. Seguidamente se sumerge la membrana en una solución de hibridación que contiene una sonda de ADN específica de la especie objeto de estudio.

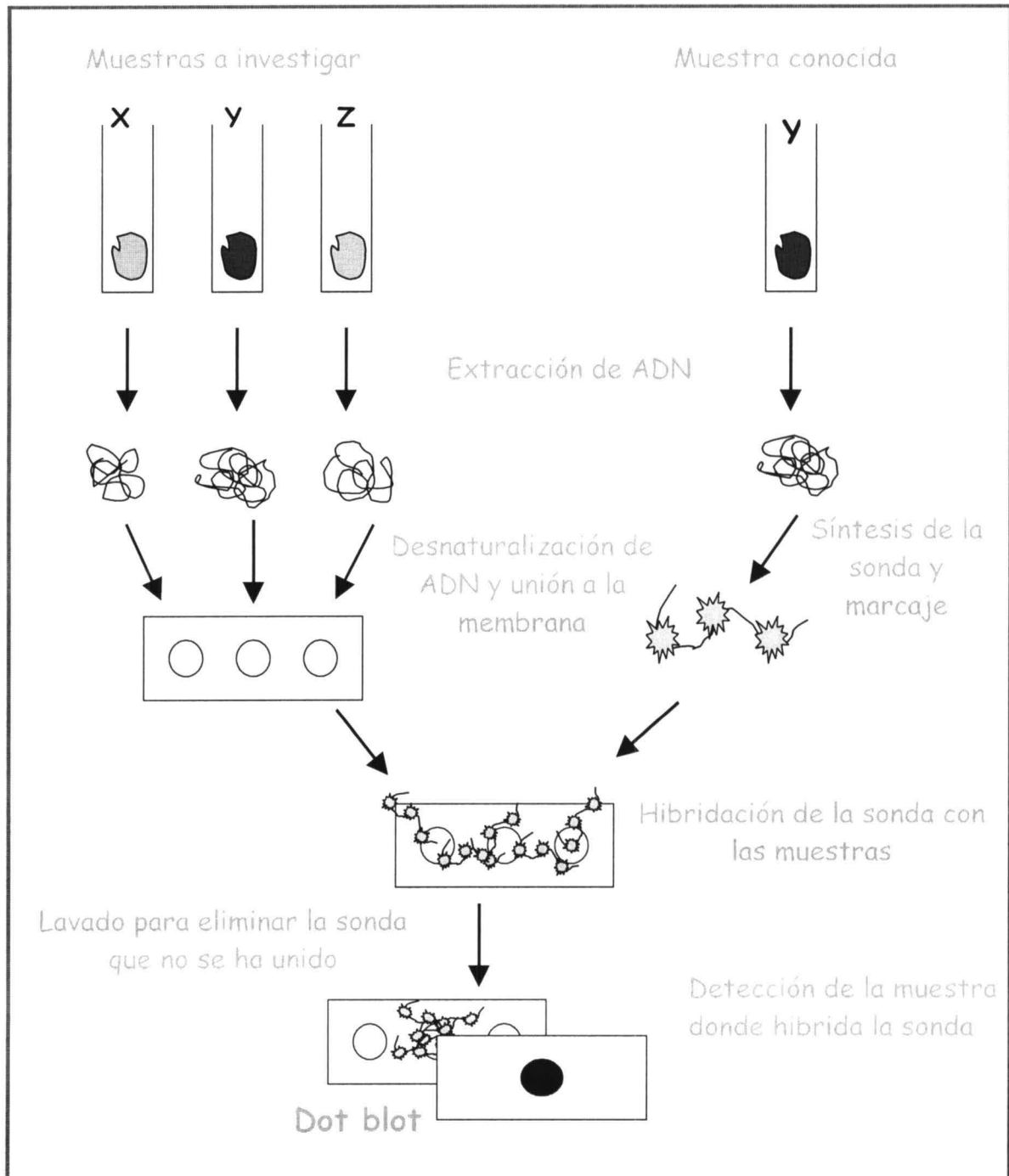


Figura 20. Esquema de la técnica de hibridación de ADN *dot blot*, que aprovecha las diferencias en el ADN nuclear para diferenciar especies. Se presentan 3 muestras (X, Y, Z), las cuales se enfrentan a una sonda específica que sólo hibrida en la muestra Y.

La sonda híbrida en los lugares de la membrana donde se encuentre su secuencia complementaria, los cuales se visualizan por auto-radiografía. La posición de las bandas obtenidas produce perfiles específicos que permiten identificar la especie o población de procedencia de las muestras por comparación con patrones adecuados.

Brock y Christiansen (1989), utilizaron la técnica de *southern blot* para diferenciar el berberecho *Cardium edule* y dos especies relacionadas *C. lamarcki* y *C. glaucum*. Estos autores, obtuvieron numerosas bandas que permitieron estudiar las relaciones filogenéticas existentes entre estas tres especies. Pérez y col. (1999), utilizaron la técnica de *southern blot* para identificar híbridos de las especies de salmónidos *Salmo salar* y *Salmo trutta*.

Esta técnica también se utiliza para el estudio del número y organización de *loci* presentes en un gen. Van Beneden y col. (1997), emplearon la técnica de *southern blot* con el fin de estudiar en la especie de almeja *Mya arenaria* la expresión de un homólogo de la proteína *p53*, que en vertebrados actúa como regulador del crecimiento celular. Comprobaron que dicho gen tiene una única copia en el genoma de *Mya arenaria*. Heath y Hilbish (1998), estudiaron el gen que codifica una proteína parecida a las protaminas (proteínas que actúan empaquetando el ADN de las células espermáticas) en tres especies de mejillón: *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. troussulus*. Estos investigadores demostraron mediante *southern blot* que había varias copias del gen en el ADN de dichas especies y observaron que existían bandas de diferentes tamaños, que correspondían a espacios intergénicos.

II.4.2.2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADNmt (RFLP) fue la primera técnica genética que se empleó en la identificación de especies. Esta técnica se basa en la diferenciación de los distintos organismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la ruptura de sus respectivos ADNs. Estos patrones, conocidos como patrones de restricción del ADN, se originan gracias a la actividad de unas enzimas, las endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas son enzimas que cortan enlaces fosfodiéster de secuencias nucleotídicas específicas de la molécula de ADN, denominadas *dianas de restricción*, y originan fragmentos de diversos tamaños que se separan por electroforesis dando lugar a perfiles de restricción característicos (*Figura 21*). Se conocen más de cien enzimas de restricción procedentes de diversas especies de bacterias, y cada una de ellas reconoce una secuencia de cuatro a ocho nucleótidos de longitud y corta la doble cadena de ADN de una forma determinada.

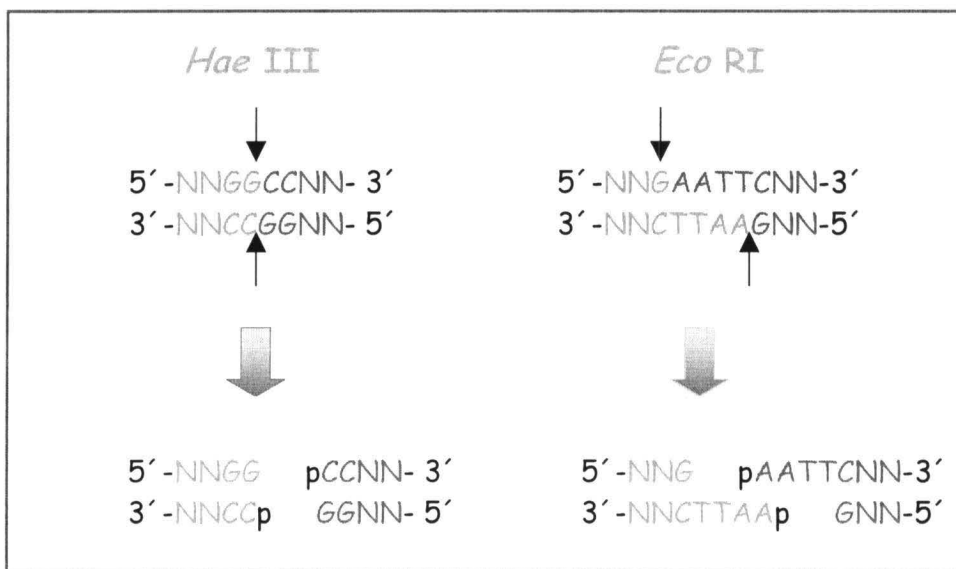


Figura 21. Esquema del punto de corte de las enzimas de restricción *Hae* III y *Eco* RI, que producen bordes romos y cohesivos respectivamente (Sambrook y col., 1989).

Las enzimas de restricción que cortan las dos cadenas del ADN en la misma posición, como la *Hae* III, producen bordes romos, mientras que las que cortan cada hebra de ADN en un punto distinto, como la *Eco* RI, originan fragmentos de ADN con extremos cohesivos. El número y posición de los lugares de restricción depende de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN. Por lo tanto, una enzima de restricción siempre cortará una determinada secuencia de ADN en los mismos fragmentos. El número y tamaño de los fragmentos generados reflejan la mayor o menor actividad de las endonucleasas en el genoma celular, y permiten poner de manifiesto mutaciones o diferencias en determinadas posiciones de la secuencia de nucleótidos. Estas diferencias se conocen como polimorfismo en la

longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), y resulta de gran utilidad para la identificación de especies.

La técnica de RFLP aplicada directamente a la identificación de especies a partir del ADNmt sin amplificar por PCR, se ha empleado en dos especies de salmónidos *Salmo salar* y *Salmo trutta* (Hynes y col., 1989), dos especies de camarón *Penaeus monodon* y *Penaeus japonicus* (Bouchon y col., 1994), las especies de ostra *Crassostrea gigas* y *C. angulata* (Boom y col., 1994; Boudry y col., 1998), la especie de mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Sanjuan y col., 1996) y las especies de vieira *Pecten maximus* y *Pecten jacobaeus* (Wilding y col., 1997; 1999). Sin embargo, la utilización de la técnica de RFLP para la identificación de especies de pescado y marisco presenta una serie de inconvenientes: los perfiles obtenidos son complejos debido al gran número de bandas de ADN que es necesario examinar; además es preciso extraer una cantidad de ADN suficiente para llevar a cabo este tipo de análisis, lo que plantea dificultades sobre todo en cuanto a tiempo y cantidad de muestra requeridos. También, hay que tener en cuenta que la aplicación de esta técnica a la identificación de especies está limitada a productos frescos y congelados, ya que la fragmentación del ADN en productos tratados por calor impide la obtención de perfiles reproducibles.

II.4.2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue ideada a mediados de la década de 1980 por el científico Kary Mullis (Saiki y col., 1985) y, al igual que la secuenciación del ADN, ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que es una técnica que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN sin recurrir a la clonación. Se basa en un principio muy sencillo, es decir, la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular.

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la repetición cíclica de tres etapas (*Figura 22*) (Watson y col., 1992):

1. **Desnaturalización del ADN bicatenario** presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.

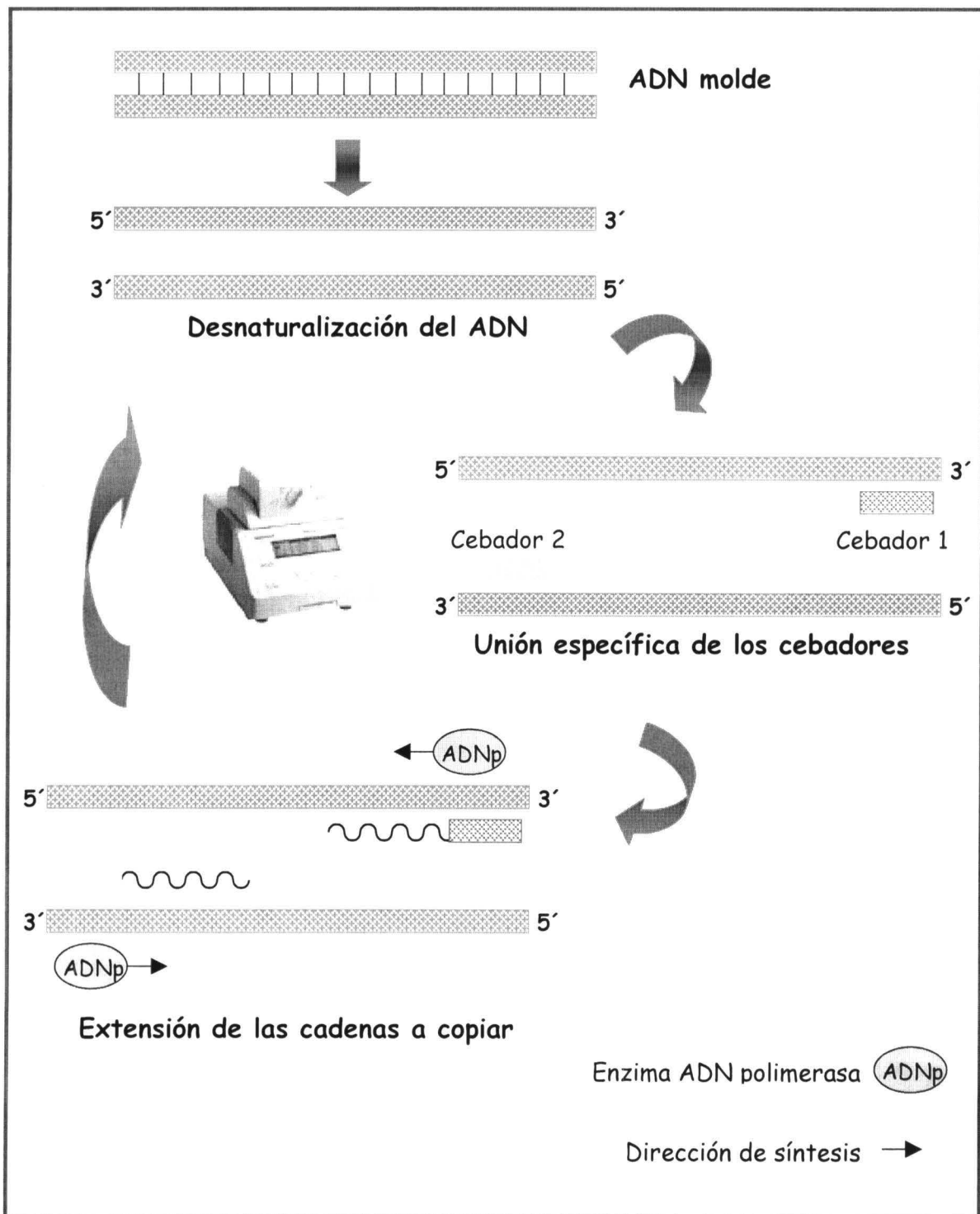


Figura 22. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2. **Unión específica de los cebadores** (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. Se suelen emplear al menos dos cebadores que, tras unirse cada uno a una cadena diferente, delimiten la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR. La temperatura a la que se realiza esta unión (T_a , *Annealing temperature*) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción, y depende de la composición de bases de los cebadores. Existen programas informáticos que calculan la temperatura de unión de los cebadores, aunque normalmente se calcula según la siguiente fórmula: $T_a (^{\circ}\text{C}) = [2(A+T) + 4(G+C) - 5]$. Cuando los cebadores empleados en una misma reacción poseen T_a diferentes, siempre se aplica la temperatura inferior.
3. **Extensión de la cadena de ADN a copiar** a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra.

Inicialmente, la ADN polimerasa que se empleaba procedía de *Escherichia coli* (Saiki y col., 1985), pero se desnaturalizaba cuando se sometía a 92°C durante la primera etapa de cada ciclo y, por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión, impidiendo la automatización del proceso. En la actualidad se utilizan enzimas termoestables como la *Taq* polimerasa (Saiki y col., 1988), procedente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*, cuyo medio natural son las aguas termales y géiseres y, por lo tanto, posee una enzima ADN polimerasa que resiste temperaturas por encima de los 90°C alcanzados durante la fase de desnaturalización. La actividad de la ADN polimerasa es dependiente de la presencia de iones magnesio en la solución, siendo la concentración de este ión un parámetro fundamental para la optimización de la reacción. La temperatura a la que ejerce su acción se sitúa en torno a los 72°C . Actualmente, además de la *Taq* polimerasa existen otras ADN polimerasas.

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los ciclos subsiguientes, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al

final de n ciclos el número de copias de ADN por cada molécula serán de 2^n . Un proceso de amplificación de entre 20 y 40 ciclos, permite amplificar por tanto 2^{20} - 2^{40} veces el número de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es un compuesto fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño también se pueden emplear geles de poliacrilamida.

El empleo de polimerasas termoestables junto con el diseño de termocicladores, que son aparatos que permiten llevar a cabo los ciclos de tiempo y temperatura necesarios de un modo rápido, han permitido la completa automatización de la técnica de PCR, así como su empleo rutinario. Otro factor clave para la expansión de esta técnica ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos, debida, por una parte, a los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos, que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes y, por otra, al desarrollo de equipos y reactivos para la síntesis rápida y económica de los mismos (Watson y col., 1992).

La principal limitación de la técnica de PCR es que requiere conocer parte de la secuencia que se quiere amplificar, o al menos aquellas regiones en las que se vayan a unir los cebadores. Esto, que en principio sería un importante obstáculo cuando queremos amplificar ADNs desconocidos, se ha conseguido resolver siguiendo diferentes caminos. Por un lado, se pueden utilizar las secuencias génicas de varias especies conocidas para buscar regiones conservadas en las que diseñar cebadores que reciben el nombre de *universales*, es decir, que permiten la amplificación del mismo gen en una gran variedad de especies (Kocher y col., 1989; Bartlett y Davidson, 1992; Skibinski, 1994; Meyer y col., 1995). En otras ocasiones, si no se conoce la secuencia de nucleótidos del gen que interesa, pero sí la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica dicho gen, se pueden diseñar cebadores que lo amplifiquen basándose en el empleo de codones de la especie objeto de estudio y en posibles homologías con genes similares que hayan sido secuenciados en otras especies (Venkatesh y Brenner, 1997). En ocasiones, se pueden emplear cebadores degenerados (Kwok y col., 1994), es

decir, una mezcla de cebadores que comprenden las distintas combinaciones de bases que pueden ocurrir en las posiciones ambiguas.

Conviene señalar que actualmente la técnica de PCR clásica es una herramienta básica, que ha servido para desarrollar otras modalidades de PCR (PCR anidada, PCR múltiple, RT-PCR), asociaciones de PCR con otras técnicas (PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-SSCP), y técnicas de amplificación distintas del PCR (LCR, 3SR, Q β). Todas ellas han sido objeto de múltiples revisiones (Hill, 1996; Lockley y Bardsley, 2000; Sweijd y col., 2000).

La técnica de PCR, sin combinar con ninguna otra técnica, se ha utilizado en pocas ocasiones para la identificación de especies de pescado y mariscos. Algunos autores han propuesto la identificación de especies mediante la técnica de PCR amplificando el gen que codifica la subunidad 5S del ARNr, cuyo tamaño es específico para cada especie. De este modo, se han identificado especies de pescado como el salmón y trucha (Pendás y col., 1995; Carrera y col., 1999a); lenguado y fletán (Céspedes y col., 1999a); y perca, mero y cherna (Asensio y col., 2001). DeSalle y Birstein (1996), utilizaron la técnica de PCR para identificar tres especies de esturión de gran importancia comercial en la producción de caviar (*Acipenser gueldenstaedti*, *Acipenser stellatus* y *Huso huso*), mediante el diseño de oligonucleótidos especie-específicos para cada una de ellas. Lockley y Bardsley (2000), diseñaron cebadores específicos para amplificar un fragmento del gen mitocondrial citocromo *b* que permitió la diferenciación del atún (*Thunnus thynnus*) y el bonito (*Sarda sarda*). Estos autores comprobaron que los productos de PCR amplificados, al ser de distinto tamaño, permitían la identificación de las dos especies sin la necesidad de recurrir a ninguna otra técnica molecular.

Inoue y col. (1995), estudiaron mediante la técnica de PCR las variaciones interespecíficas de la proteína de adhesión a la superficie de las especies de mejillón *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. Estos autores diseñaron dos parejas de cebadores, una para amplificar una región repetitiva del gen que codifica dicha proteína y la otra para amplificar una región no repetitiva. Con los dos cebadores que amplificaron la región repetitiva, la longitud de los fragmentos amplificados resultó ser muy variable, incluso entre muestras de la misma especie. Pero con los dos cebadores que amplificaban la región no repetitiva, comprobaron que la longitud de los fragmentos amplificados era distinta para las tres especies e

igual para los individuos de la misma especie, dando lugar a fragmentos de 180, 168 y 126 pb (pares de bases) en *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, respectivamente. Rawson y col. (1996), estudiaron también el gen *Glu*, que codifica a la proteína de adhesión a las superficies de las especies de mejillón *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*. Comprobaron que el extremo 5' de dicho gen presentaba un polimorfismo de inserción/delección de 55 pb en el que difieren *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*, permitiendo así la diferenciación de estas especies únicamente realizando la técnica de PCR.

La técnica de PCR aplicada como única herramienta a la diferenciación de especies presenta el inconveniente de que es necesario conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, con el fin de poder diseñar nucleótidos específicos para cada una de ellas. Esto podría justificar lo poco que se ha utilizado la PCR sin combinar con ninguna otra técnica, ya que hay muchas especies de pescado y marisco de las que no se conoce ninguna secuencia. Sin embargo, también ha sido escasa su utilización en la identificación de especies de carne (Meyer y col., 1994), de las que sí existe mayor información en las bases de datos, lo que induce a pensar en la dificultad de diseñar cebadores que sean específicos para una sola especie.

Sin embargo, el uso combinado de la PCR con otras técnicas complementarias, como la secuenciación, la técnica de RFLP o la técnica de SSCP, sí ha hecho posible la identificación de un gran número de especies de pescado y marisco.

II.4.2.3.1. Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación por PCR de un determinado fragmento génico y su posterior secuenciación. Mediante el estudio de las secuencias obtenidas, se pueden identificar diferencias incluso entre especies muy cercanas.

Para seleccionar adecuadamente el gen que se debe amplificar conviene tener en cuenta varias premisas (Bartlett y Davidson, 1992):

- La región del genoma que se va a amplificar debe acumular mutaciones con suficiente rapidez para que organismos estrechamente relacionados tengan

diferentes secuencias nucleotídicas, pero con la suficiente lentitud para que la variación intraespecífica no sea importante.

- El tamaño del segmento de ADN ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias de secuencia entre especies próximas, pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación.
- Debería elegirse un gen que codifique una proteína. De este modo, los errores de amplificación y/o secuenciación pueden detectarse traduciendo la secuencia de nucleótidos y comparándola con la secuencia aminoacídica.
- La existencia de secuencias del gen seleccionado en las bases de datos correspondientes a otros organismos sería de gran interés, ya que permitiría comparar dichas secuencias con las obtenidas en nuestro estudio.

El análisis de las secuencias obtenidas suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. Inicialmente se desarrollaron programas basados en la elaboración de árboles filogenéticos (Bartlett y Davidson, 1992), que mediante la comparación de la secuencia de la especie objeto de estudio con otras especies previamente secuenciadas e introducidas en la base de datos, permiten el estudio filogenético de la especie analizada (Saitou y Nei, 1987; Bartlett y Davidson, 1992; Van de Peer y de Wachter, 1993; Swofford, 1993). Actualmente, se dispone además de programas que permiten identificar la especie de una muestra problema basándose en la elaboración de matrices de valoración de distancias genéticas entre las secuencias de la base de datos y la muestra (Forrest y Carnegie, 1994; Meyer y Candrian, 1996).

Uno de los genes que se ha empleado con mayor frecuencia en la diferenciación de especies es el gen mitocondrial citocromo *b*. Bartlett y Davidson (1991), identificaron 4 especies de atún del género *Thunnus* (*Thunnus thynnus*, *T. obesus*, *T. albacares* y *T. alalunga*) mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación de un fragmento de 359 pb del gen citocromo *b*. Estos mismos autores, basándose en este estudio desarrollaron una técnica de identificación de especies denominada FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*), que consistía en la construcción de bases de datos con las secuencias de este fragmento en diferentes especies y la comparación de la secuencia problema con los patrones de la base de datos. Utilizando esta técnica consiguieron identificar

correctamente numerosas especies de pescado (salmón, arenque, bacalao, etc.) sometidas a diferentes procesados (Bartlett y Davidson, 1992). Actualmente se dispone de la secuencia total o parcial de este gen en numerosas especies animales (Kocher y col., 1989; Irwin y col., 1991; Wolf y col., 1999), y diversas especies de pescado (Ram y col., 1996; Árnason y col., 1998; Quinteiro y col., 1998).

Además del citocromo *b* se han utilizado otros genes del genoma mitocondrial para la identificación y estudio de árboles filogenéticos de especies de pescado y marisco. Entre estos genes cabe destacar los ARN ribosómicos 12S y 16S (DeSalle y Birstein, 1996). El gen mitocondrial 16S del ARNr se ha utilizado en numerosas ocasiones ya que constituye una herramienta muy útil en estudios filogenéticos, proporcionando información de la sistemática de vertebrados terrestres y marinos (Allard y col., 1992; Milinkovitch y col., 1993; Tringali y col., 1999), así como de invertebrados marinos, entre los que se incluyen el cangrejo (Cunningham y col., 1992), especies de mejillón del género *Mytilus* spp. (Geller y col., 1993), especies del género *Littorina* (Rumbak y col., 1994), especies de los géneros *Calanus* y *Metridia* (Bucklin y col., 1995), especies de la familia Venéridos (Canapa y col., 1996), y distintas especies de la familia Pectínidos (Canapa y col., 2000). Además se han estudiado otros genes mitocondriales mediante secuenciación de fragmentos amplificados por PCR, como los genes que codifican para las subunidades de la NADH deshidrogenasa (Cronin y col., 1991), la subunidad I de la citocromo c oxidasa (Foighil y col., 1998) y la región control (Nielsen y col., 1994; Alvarado-Bremer y col., 1997).

Algunos fragmentos de genes nucleares también se han utilizado para la diferenciación de especies y el estudio de las relaciones filogenéticas mediante PCR-secuenciación. Kenchington y col. (1993), identificaron dos especies de vieira, *Chlamys islandica* y *Placopecten magellanicus*, mediante la secuenciación de un fragmento de 1.815 pb del gen que codifica la subunidad 18S del ARNr. Rice y col. (1993), analizaron este mismo gen y establecieron las relaciones filogenéticas existentes entre tres especies de vieira (*Chlamys islandica*, *Placopecten magellanicus* y *Argopecten irradians*) y 7 especies de almejas de la familia Máctridos (*Spisula solida*, *S. subtruncata*, *Tresus nuttalli*, etc.). Steiner y Müller (1996), compararon la secuencia completa del gen 18S ARNr de dos especies de

moluscos, *Arca noae* y *Atrina pectinata*, con 11 secuencias de moluscos publicadas (*Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *Chlamys islandica*, etc.), con el fin de verificar la utilidad de dicho gen en estudios filogenéticos. Canapa y col. (1999), estudiaron la secuencia nucleotídica completa del gen 18S ARNr de dos especies de la familia Venéridos: *Callista chione* y *Venus verrucosa*. Estos autores compararon las secuencias obtenidas con 19 secuencias de bivalvos publicadas previamente y establecieron las relaciones filogenéticas entre estas especies, llegando a la conclusión del origen monofilético de la familia Venéridos.

Además, se han analizado otros genes nucleares para establecer la identidad, clasificación y filogenia de especies de pescado, como los genes de la hormona de crecimiento (McKay y col., 1996; Venkatesh y Brenner, 1997), y el gen supresor de tumores *p53* (Kusser y col., 1994).

No obstante, la secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR es una herramienta analítica cara, laboriosa y que requiere personal especializado. Por lo tanto, no resulta adecuada para la identificación rutinaria de especies en laboratorios de control de los alimentos, en los que se requiere disponer de técnicas sencillas, rápidas y de bajo coste para llevar a cabo el análisis de un gran número de muestras (Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998).

II.4.2.3.2. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP)

La técnica de PCR-RFLP consiste en el uso combinado de la técnica de RFLP, explicada anteriormente, y la técnica de PCR. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos mediante PCR, y su posterior tratamiento con enzimas de restricción, que los cortan en trozos más pequeños.

Esta técnica presenta importantes ventajas en la identificación de especies, con relación al estudio del polimorfismo con enzimas de restricción del ADNmt total (RFLP):

- Los perfiles de ADN obtenidos tras la electroforesis son más fáciles de interpretar, puesto que están formados por un menor número de bandas.
- Una pequeña cantidad de ADN es suficiente para llevar a cabo el análisis, ya que se obtiene un gran número de copias tras su amplificación por PCR. Por lo que se reduce significativamente la cantidad de muestra necesaria.

- Se pueden analizar muestras procesadas, incluso sometidas a tratamientos de esterilización como es el caso de los productos enlatados (Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998), aunque la degradación del ADN en estos productos limita el tamaño del fragmento que se podrá amplificar (Unsel y col., 1995).

La elección de las endonucleasas de restricción que se van a emplear en la técnica de PCR-RFLP puede realizarse al azar o estar basada en el conocimiento y comparación previos de las secuencias del fragmento analizado. En cualquier caso, es imprescindible seleccionar enzimas que no presenten variaciones intraespecíficas, lo cual se comprueba mediante el estudio de un número adecuado de muestras. Por otro lado, la eficacia de la técnica de PCR-RFLP depende del grado de variabilidad genética de la secuencia elegida, así como de su tamaño. Ambos han de ser suficientes para detectar variaciones interespecíficas, pero no intraespecíficas. Si se seleccionan enzimas adecuadas que tengan puntos de corte distintos en los productos de PCR de las especies que se quieren diferenciar, se producen fragmentos de distintos tamaños en cada especie. Al examinar mediante electroforesis los productos de la digestión, se ponen de manifiesto los tamaños de los fragmentos generados y se puede identificar la especie de procedencia de la muestra analizada por comparación con los patrones de referencia (*Figura 23*).

La técnica de PCR-RFLP se ha aplicado también al estudio de la variabilidad genética de poblaciones dentro de una especie. En este caso, es necesario utilizar regiones que presentan gran variabilidad genética intraespecífica, como la región de control y otros genes mitocondriales como el 16S ARN ribosómico, distintas subunidades de la enzima NADH deshidrogenasa y citocromo c oxidasa o fragmentos de ADN de gran tamaño. De este modo, se ha estudiado la variabilidad genética de poblaciones de mejillón (Rawson y Hilbish, 1995; Baldwin y col., 1996; Saavedra y col., 1996), ostras (Banks y col., 1993; Foighil y col., 1995), anguila (Aoyama y col., 2000), salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Adams y col., 1994) y trucha (*Salmo trutta*) (Hansen y Loeckhke, 1996), entre otras muchas especies de pescado y marisco.

Para la identificación de especies mediante PCR-RFLP se han seleccionado, por el contrario, zonas más conservadas y fragmentos más pequeños. Los genes mitocondriales han sido los más empleados, principalmente el gen que codifica el citocromo *b* y en menor medida, el gen que codifica la subunidad 12S del ARNr.

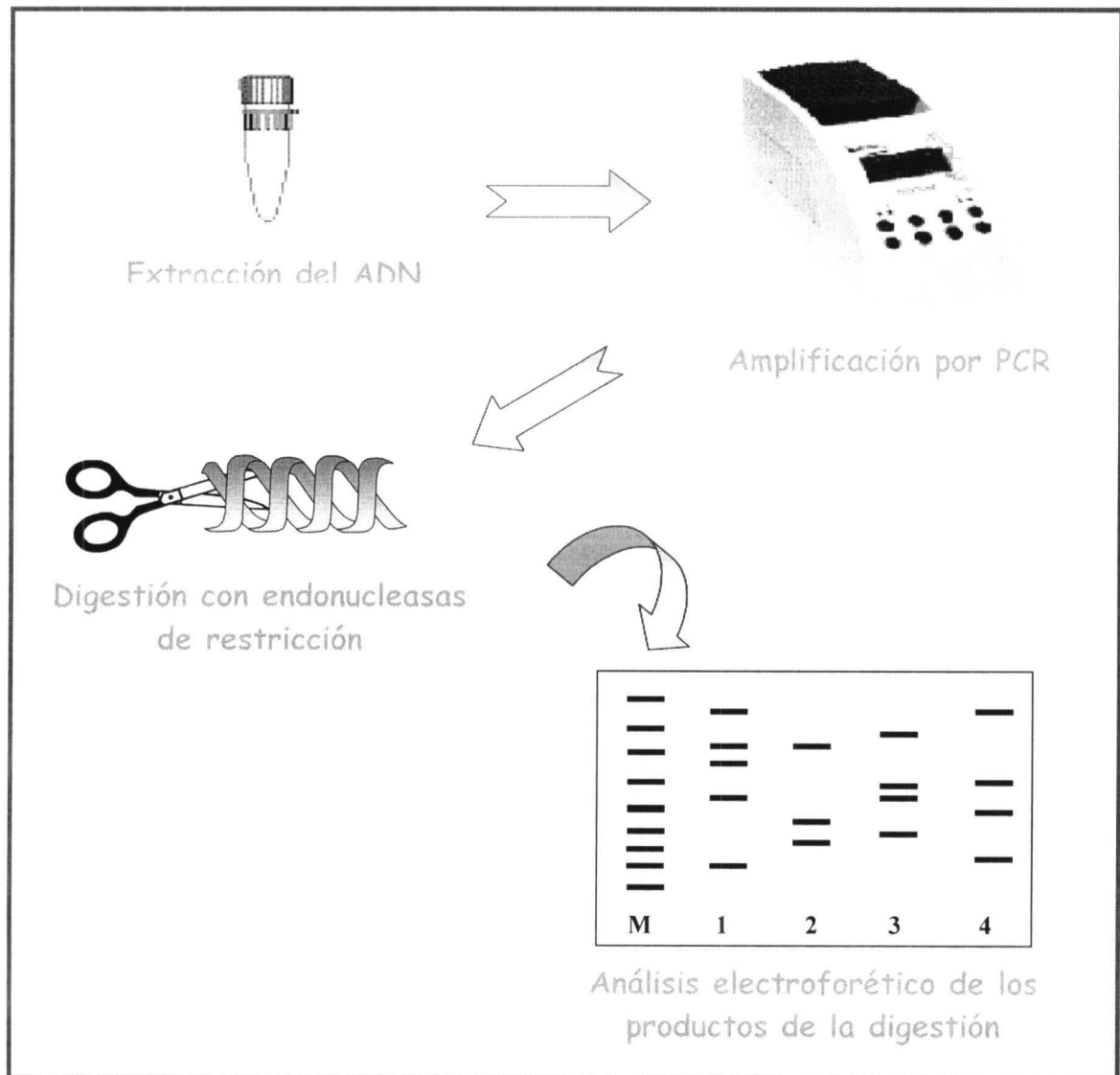


Figura 23. Esquema del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones del ADN amplificadas por PCR (PCR-RFLP).

Así, por ejemplo, el gen que codifica el citocromo *b* se ha empleado en numerosas especies de pescados y mariscos: anguila (Tagliavini y col., 1995; Zhang y col., 1999), salmón y trucha (Carrera y col., 1998; Russell y col., 2000), pescados planos (Céspedes y col., 1998) y diversas especies de túnidos (Unsel y col., 1995; Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998), entre otras. La técnica de PCR-RFLP del gen 12S del ARNr se ha utilizado para diferenciar dos especies de esturión *Acipenser sturio* y *A. naccari* (Ludwig y Kirschbaum, 1998); lenguado y fletán (Céspedes y col., 2000) y mero, perca y cherna (Asensio y col., 2000), entre otras especies.

Chow y col. (1993), emplearon ambos genes (citocromo *b* y 12S del ARNr) para la identificación de 13 especies de la subfamilia Lutjaninae (géneros *Lutjanus*, *Ocyurus* y *Rhomboplites*). Consiguieron identificar con ambos fragmentos 8 especies de las 13 estudiadas. Bouchon y col. (1994), emplearon la técnica de PCR-RFLP con el fin de identificar dos especies de camarón (*Penaeus monodon* y *P. japonicus*). Para ello amplificaron un fragmento de 415 pb del gen que codifica la subunidad 12S del ARNr y otro fragmento de 520 pb del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr. Con los dos fragmentos consiguieron identificar ambas especies.

Algunos genes nucleares también se han utilizado con éxito en la identificación de especies de pescados y mariscos. Silberman y Walsh (1992) identificaron tres especies de langosta (*Panulirus argus*, *P. guttatus* y *P. laevicauda*) mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen que codifica la subunidad 28S ARNr. Del mismo modo, basándose en el gen que codifica la subunidad 18S del ARNr, Kenchington y col. (1993) diferenciaron dos especies de vieiras (*Chlamys islandica* y *Placopecten magellanicus*), y Toro (1998) utilizando el gen nuclear Glu-5 identificó tres especies de mejillón (*Mytilus edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*).

La técnica de PCR-RFLP, a diferencia de la técnica de PCR-Secuenciación, es sencilla, rápida y no requiere el uso de instrumental complejo, resultando muy apropiada para el análisis rutinario en laboratorios de control de calidad y análisis de alimentos (Meyer y col., 1995; Ram y col., 1996; Quinteiro y col., 1998).

II.4.2.3.3. Análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP)

La técnica de PCR-RFLP aplicada a la identificación de especies en productos procesados, puede presentar un inconveniente, ya que debido a la degradación del ADN, sólo se pueden amplificar por PCR fragmentos pequeños. Dichos fragmentos, al ser tratados con enzimas de restricción generan oligonucleótidos demasiado cortos para poder ser visualizadas claramente en los geles convencionales de electroforesis. Sin embargo, el análisis del polimorfismo de conformación de hebras de ADN monocatenario (SSCP) puede resultar muy adecuado en estos casos.

Orita y col. (1989a, 1989b) desarrollaron por primera vez la técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) y, desde entonces, se ha utilizado en un gran número de aplicaciones, principalmente en el campo de la medicina (Glavac y Dean, 1993). Esta técnica se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de ADN monocatenario y su conformación que, en definitiva, es un reflejo de su secuencia nucleotídica. En esta técnica, el ADN bicatenario (ADNbc) se desnaturaliza para obtener las dos hebras de ADN monocatenario (ADNmc), que a continuación se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones no desnaturalizantes. Cualquier diferencia en la secuencia de ADN da lugar a un cambio en la movilidad de las moléculas de ADNmc, visualizándose al final del proceso. La sensibilidad de esta técnica permite detectar mutaciones puntuales en los productos amplificados por PCR, por lo que se ha utilizado para diagnosticar alteraciones genéticas en ciertas enfermedades humanas (Dean y col., 1990; Hurk y col., 1992).

Sin embargo, no existe una teoría capaz de explicar y predecir la conformación de las moléculas de ADNmc en función de su secuencia, o la movilidad de dichas moléculas en función de su conformación, por lo tanto, la técnica de PCR-SSCP es una técnica bastante empírica (Fujita y Silver, 1994).

Con la técnica de PCR-SSCP se espera visualizar dos bandas de ADNmc para cada gen amplificado, pero en ocasiones pueden aparecer más de dos bandas con distinta intensidad. Esto es debido a que la conformación de las cadenas sencillas de ácidos nucleicos varía en función de factores como la temperatura, concentración del gel, proporción acrilamida/bisacrilamida, tipo de solución desnaturalizante empleada, adición de distintos compuestos al gel, etc., los cuales modifican su movilidad en el mismo (Hayashi, 1991; Glavac y Dean, 1993; Rehbein y col., 1997a; Céspedes y col., 1999b). Además, la eficacia de esta técnica está condicionada por el grado de variabilidad genética que presente el fragmento seleccionado. Un aspecto especialmente importante es el tamaño del fragmento amplificado, que no debe ser superior a 300 pb (Hayashi, 1996).

La aplicación de la técnica de PCR-SSCP a la identificación de especies de productos del mar es bastante reciente, habiéndose aplicado a la identificación de diversas especies de pescado (Hara y col., 1994; Céspedes y col., 1999b) y algunas especies de animales de abasto (Marklund y col., 1995; Rea y col., 1996).

Rehbein y col. (1995b), amplificaron fragmentos del gen citocromo *b* de 123 pb y 148 pb para la diferenciación por SSCP de varias especies de atunes y bonito (*Sarda sarda*) congelados y enlatados. Aunque no pudieron diferenciar entre la albacora (*Thunnus alalunga*) y el atún rojo (*Thunnus thynnus thynnus*), debido a que la secuencia de nucleótidos es idéntica en ambas especies en este fragmento (Unseld y col., 1995).

Oohara (1997), empleó esta técnica para identificar dos variedades de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) que no pudieron ser diferenciadas mediante la técnica de PCR-RFLP. Para ello amplificó un fragmento de 300 pb del gen mitocondrial que codifica la enzima ATPasa.

Rehbein y col. (1997b), amplificaron por PCR fragmentos cortos del gen mitocondrial citocromo *b*, de 358 bp, 148 pb y 123 pb, y analizaron el polimorfismo de conformación de las hebras sencillas de ADN para verificar el correcto etiquetado de 4 especies del género *Anguilla* (*A. anguilla*, *A. japonica*, *A. rostrata* y *A. australis*), 4 especies de salmónidos (*Salmo trutta*, *S. salar*, *Salvelinus fontinalis* y *Oncorhynchus mykiss*), 3 especies de esturión (*Huso huso*, *Acipenser gueldenstaedti* y *Acipenser stellatus*) y 3 especies de pescado enlatado (*Sardina pilchardus*, *Clupea harengus* y *Gadus morhua*). Posteriormente identificaron mediante PCR-SSCP 6 especies de esturión de gran importancia comercial en la producción de caviar (*Acipenser gueldenstaedti*, *A. persicus*, *A. ruthenus*, *A. nudiventris*, *A. stellatus* y *Huso huso*), empleando para ello dos fragmentos del gen mitocondrial citocromo *b* de 116 pb y 123 pb (Rehbein y col., 1999c). También con esta técnica, diferenciaron 8 especies de túnidos (*Thunnus alalunga*, *Sarda sarda*, *Auxis thazard*, *Katsuwonus pelamis*, entre otros), analizando un fragmento de 123 pb del gen citocromo *b* (Rehbein y col., 1999b). Estos autores comprobaron la reproducibilidad de los resultados obtenidos repitiendo los análisis en 8 laboratorios de diferentes países de la Unión Europea, identificando correctamente la especie de procedencia de la muestra de pescado en un 90,3% del total de muestras. En este trabajo, también estudiaron la existencia de variaciones intraespecíficas, observando alguna variabilidad en los patrones de *Katsuwonus pelamis* y *Sarda sarda*, en los que se encontraron 3 y 2 patrones de SSCP distintos, respectivamente, en el segmento de ADN analizado.

Céspedes y col. (1999b), emplearon un fragmento de 201 pb del gen mitocondrial citocromo *b* para identificar por PCR-SSCP cuatro especies de pescados planos: lenguado (*Solea solea*), solla (*Pleuronectes platessa*), platija (*Platichthys flesus*) y fletán (*Reinhardtius hippoglossoides*). Obtuvieron patrones especie-específicos en las cuatro especies de pescado estudiadas.

Martínez y Daníelsdóttir (2000), utilizaron las técnicas de SSCP y el estudio del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) para la identificación de especies de mamíferos marinos: foca (*Phoca groenlandica*) y 3 especies de ballenas (*Balaenoptera borealis*, *B. acutorostrata* y *B. physalus*), empleando tanto muestras frescas como procesadas (ahumadas, congeladas, secadas, etc.). Mediante la técnica de PCR-SSCP, amplificaron dos fragmentos de 358 pb y 148 pb del gen citocromo *b*. Sin embargo, con la técnica de RAPD obtuvieron perfiles específicos de especie más fáciles de interpretar que con la técnica de PCR-SSCP.

En moluscos, la técnica de PCR-SSCP se ha empleado para estudios de variabilidad genética entre larvas de ostra (*Crassostrea gigas*) recogidas en diferentes temporadas (Li y Hedgecock, 1998), más que para la identificación de especies.

Las ventajas de la técnica de PCR-SSCP con relación a otras técnicas genéticas para identificar especies son:

- Permite analizar fragmentos pequeños de ADN, procedentes de muestras degradadas durante el procesado.
- Cambios puntuales en la secuencia de nucleótidos del ADN monocatenario (ADNmc) determinan una conformación diferente de las moléculas, que pueden separarse electroforéticamente. Esto supone una ventaja frente a la técnica de PCR-RFLP, la cual está condicionada por la existencia de enzimas de restricción que tengan su diana en el lugar de la mutación (Oohara, 1997).
- Su gran poder de detección de mutaciones hace que sea una técnica muy adecuada para la identificación de especies muy próximas (Rehbein y col., 1997a), en las que se pueden encontrar muy pocas diferencias en las secuencias.

- La técnica de PCR-SSCP es una técnica rápida y fácil de desarrollar, al igual que la técnica de PCR-RFLP resulta muy adecuada para análisis rutinarios en programas de control de calidad. Los perfiles de bandas de ADN que se obtienen son sencillos de interpretar debido al reducido número de bandas que presentan.
- Las mutaciones se detectan mediante cambios de movilidad de las moléculas, no mediante ausencia de señal como sucede en otras técnicas genéticas, por lo que un fallo en la amplificación por PCR no da lugar a falsos positivos.

En cuanto a los inconvenientes de esta técnica conviene señalar:

- Es necesario analizar muestras de referencia en el mismo gel junto con las muestras problema.
- Los patrones SSCP aportan menos información que la secuenciación de las cadenas de ADN.
- Antes de trabajar con geles preformados comerciales, tipo *PhastSystem*[®], la técnica requería el uso de nucleótidos radioactivos y de geles grandes.

II.4.2.3.4. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), denominada también por otros autores AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) o DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), fue desarrollada inicialmente por dos grupos investigadores en 1990 (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Esta técnica genética se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos del ADN nuclear mediante PCR, utilizando para ello un único cebador, normalmente de 9-15 bases, cuya secuencia se escoge al azar (*Figura 24*). En esta técnica las temperaturas empleadas para la unión del cebador al ADN molde (T_a) son más bajas que en una PCR tradicional (35-39°C), lo cual favorece la inespecificidad de la reacción.

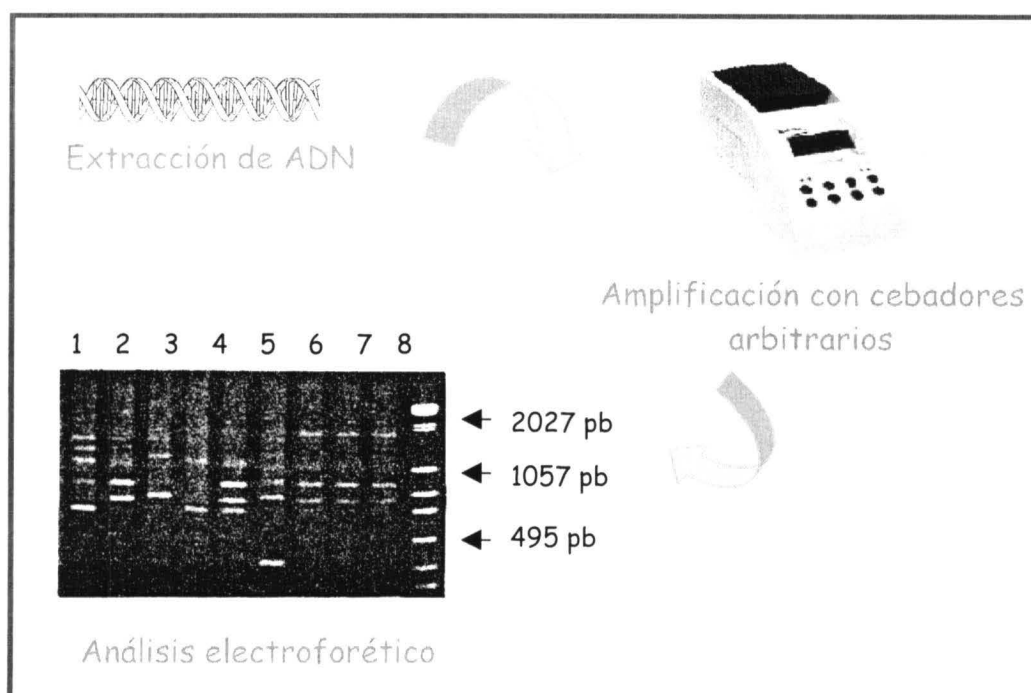


Figura 24. Esquema de la técnica de PCR-RAPD. Perfiles de bandas de ADN obtenidos a partir de diferentes individuos del crustáceo *Metapenaeus ensis* (Meruane y col., 1997).

Posteriormente, los fragmentos amplificados se analizan mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, aunque se pueden analizar también en geles de poliacrilamida y tinción de plata, si se quiere obtener mayor resolución (Bowditch y col., 1993). El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado ADN se mantiene constante siempre que se utilice el mismo cebador, y se haga el análisis en las mismas condiciones. De este modo se pueden diferenciar los ADNs a nivel de especie e incluso a nivel de individuo (Bielawski y Pumo, 1997; Dahle y col., 1997).

A pesar de su reciente introducción, la técnica de RAPD se ha empleado con éxito en la identificación de especies de pescado y mariscos. Dinesh y col. (1993, 1995), identificaron 10 especies de pescado tropical (*Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Colisa lalia*, etc.) y dos especies de la familia *Salmonidae* (*Oncorhynchus nerka* y *Salmo salar*), utilizando cebadores de 9, 10, 16 y 20 nucleótidos. Los mejores resultados se obtuvieron analizando los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (dPAGE) con urea y posterior tinción de los geles con plata.

Bardakci y Skibinski (1994), identificaron mediante RAPD tres especies de tilapia del género *Oreochromis* (*O. aureus*, *O. mossambicus* y *O. niloticus*), y cuatro subespecies de *O. niloticus* (*O. n. vulcani*, *O. n. barigoensis*, *O. n. niloticus* y *O. n. baobab*). Los cebadores empleados fueron de 10 nucleótidos y con cada uno de ellos obtuvieron perfiles específicos para cada una de las especies y/o subespecies estudiadas. Asimismo, Dinesh y col. (1996) utilizaron la técnica de RAPD para diferenciar genéticamente las tres especies citadas del género *Oreochromis* (*O. aureus*, *O. mossambicus* y *O. niloticus*), pero empleando un único cebador de 16 nucleótidos de longitud. Estos autores identificaron 13 marcadores genéticos que permitieron distinguir las 3 especies analizadas.

Partis y Wells (1996), identificaron 8 especies de pescado de interés comercial en Australia (*Lates calcarifer*, *Lates niloticus*, *Zeus faber*, etc.) mediante RAPD, utilizando como cebador el secuenciador universal de 19 nucleótidos M13 (inverso). Elo y col. (1997), consiguieron identificar salmón (*Salmo salar*), trucha (*Salmo trutta*) y sus híbridos, mediante los perfiles obtenidos con la técnica de RAPD.

Scheider y col. (1997), estudiaron 29 especies de pescado de interés comercial (*Gadus morhua*, *Anguilla anguilla*, *Melanogrammus aeglefinus*, etc.), mediante la técnica de RAPD. Obtuvieron perfiles específicos para cada una de las especies estudiadas tanto en muestras frescas como congeladas e incluso en muestras sometidas a intensos tratamientos térmicos.

Meruane y col. (1997), emplearon dos cebadores de 10 nucleótidos, para identificar mediante RAPD perfiles específicos de especie en individuos adultos de dos especies de crustáceos (*Penaeus japonicus* y *Metapenaeus ensis*) y larvas cultivadas de *M. ensis*. Con uno de los cebadores obtuvieron perfiles específicos que permitieron diferenciar los individuos adultos y las larvas de las dos especies analizadas. Sin embargo, con el otro cebador se obtuvieron perfiles diferentes en los distintos individuos, por lo que se puede emplear para el análisis de poblaciones de la familia Penaeídeos.

André y col. (1999), emplearon la técnica de RAPD para la identificación de individuos adultos y larvas de dos especies de moluscos bivalvos *Cerastoderma edule* y *C. lamarcki*. En un estudio realizado en tres laboratorios, con

termocicladores distintos y 200 individuos diferentes, obtuvieron perfiles específicos que permitieron la identificación de estas dos especies. Además, para verificar la especificidad de los perfiles obtenidos, también examinaron otras especies de moluscos como *Mya arenaria*, *Venerupis pullastra*, *Mytilus edulis*, *Scrobicularia plana* y *Macoma baltica*.

Las principales ventajas de la utilización de RAPD para la identificación de especies de pescado y marisco son:

- No es necesario conocer previamente las secuencias de ADN que se van a analizar, ya que el diseño del cebador es arbitrario (Caetano-Anollés y col., 1991).
- Se necesita muy poca cantidad de muestra.
- Permite examinar un gran número de polimorfismos en el ADN (Bowditch y col., 1993), lo cual resulta útil en la identificación de especies íntimamente relacionadas (Bowditch y col., 1993; Partis y Wells, 1996), o en especies que presentan un bajo nivel de variabilidad genética (Bielawski y Pumo, 1997; Meruane y col., 1997).
- Es una técnica sencilla, rápida y barata, ya que no requiere el uso de instrumental especial.

Sin embargo, esta técnica presenta también importantes inconvenientes:

- Es difícil obtener resultados reproducibles. La amplificación ha de desarrollarse bajo condiciones estrictamente controladas y estandarizadas. Cualquier modificación en la temperatura, número de ciclos, concentración de magnesio, o incluso en el aparato utilizado, puede alterar los perfiles obtenidos (Bowditch y col., 1993; Ramser y col., 1996).
- Al no tener un conocimiento previo de la secuencia del ADN con que se trabaja, hay que tener en cuenta el gran polimorfismo intra- e interespecífico que se puede presentar.
- El ADN de partida ha de tener una calidad razonable, ya que de lo contrario los resultados no serán reproducibles (Partis y Wells, 1996). Por lo tanto, es difícil aplicar esta técnica en la identificación de especies sometidas a tratamientos térmicos, ya que en la mayoría de ellas el ADN se encuentra degradado (Unsel

y col., 1995; Ram y col., 1996). El trabajo de Scheider y col. (1997), es el único hasta el momento, en esta línea.

- Es necesario utilizar patrones de muestras conocidas para poder comparar los resultados con las muestras analizadas (Koh y col., 1998).
- Esta técnica no permite detectar ADN de un determinado organismo en mezclas complejas de ADN, lo que puede limitar su aplicación al análisis de alimentos (Meyer y Candrian, 1996).

II.4.2.3.5. Estudio de secuencias repetitivas del ADN cromosómico

Las técnicas genéticas analizadas hasta ahora, se basan en la identificación de especies mediante el análisis de las diferencias en la secuencia nucleotídica de sus respectivos ADNs. No obstante, en el ADN nuclear existe otro tipo de variación que consiste en diferencias en el número de copias de determinadas secuencias nucleotídicas. En los últimos años, se ha centrado la atención en el estudio del número de copias repetidas con el fin de utilizarlas como marcadores genéticos en la identificación de especies y subespecies (Ferguson y col., 1995; Beacham y col., 1996).

El estudio de las secuencias repetitivas del ADN cromosómico, se ha empleado principalmente para el análisis de la variabilidad genética de poblaciones de especies de pescado y marisco (Wright y Bentzen, 1994; Colbourne y col., 1996). Estas secuencias repetitivas del ADN nuclear se clasifican atendiendo a su tamaño en satélites, minisatélites y microsatélites. Cada uno de los alelos de un individuo difiere en el número de unidades repetitivas que contiene en un *locus* determinado. Debido a la elevada tasa de mutación que presentan los satélites, minisatélites y microsatélites y al gran número de alelos posible, estas regiones del genoma constituyen marcadores genéticos interesantes para la identificación de especies (Wright, 1993). De ellos, los minisatélites y microsatélites han sido los más empleados en la identificación de especies.

Los satélites consisten en unidades repetitivas de cientos a miles de pares de bases que se repiten miles o incluso millones de veces. Se pueden aislar de ADN genómico mediante centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. Se les denomina satélites porque tras su separación en los gradientes aparecen como una banda distinta de la banda de ADN genómico.

Los minisatélites son secuencias de ADN de entre 9-100 pb, que se repiten de dos a cientos de veces en un determinado *locus* del cromosoma. Algunos minisatélites son los fragmentos de ADN más variables que se conocen, con una heterozigosidad próxima al 100% y un nivel de mutación del 2% por generación. Los estudios mediante el análisis de minisatélites polimórficos para la identificación de especies incluyen mamíferos, aves, pescados y mariscos.

Los microsatélites son secuencias de 1 a 5 pares de bases que se repiten hasta cien veces en un determinado *locus*. Los microsatélites están distribuidos aleatoriamente por el cromosoma y no se localizan como los minisatélites, en las regiones próximas al centrómero y telómero. Tienen dos características muy interesantes para la identificación de especies, como son el polimorfismo y la heredabilidad. Su alto polimorfismo permite tener un gran número de alelos distintos en cada *locus*, y por lo tanto, una gran capacidad de discriminación.

II.4.2.3.5.1. Satélites

En general, los satélites han sido las secuencias menos estudiadas, debido a su gran tamaño. Garrido-Ramos y col. (1995), utilizaron dos satélites aislados a partir de dos especies distintas de espáridos (*Sparus aurata* y *Pagrus auriga*), para estudiar las relaciones filogenéticas de esta familia, obteniendo perfiles específicos para cada una de las especies estudiadas. Abuín y col. (1996), identificaron un satélite en el salmón (*Salmo salar*) que resultó estar presente también en el genoma de la trucha (*Salmo trutta*). En invertebrados marinos, las secuencias de ADN satélite se han estudiado poco. Se han realizado estudios de ADN satélite para analizar las relaciones filogenéticas entre especies, así como para estudios de poblaciones en crustáceos del género *Artemia* (Badaracco y col., 1987), en la especie de camarón *Penaeus vannamei* (Bagshaw y Buckholt, 1997), equinodermos (Sainz y Cornudella, 1990), y en moluscos bivalvos como *Donax trunchulus* (Plohl y Cornudella, 1996) y el mejillón *Mytilus edulis* (Ruiz-Lara y col., 1992).

II.4.2.3.5.2. Minisatélites y Microsatélites

Análisis simultáneo de varios *loci*

Los minisatélites se empezaron a estudiar examinando varios *loci* de un modo simultáneo. Esta técnica, se denomina *Multilocus minisatellite DNA*

fingerprinting, y consiste en la digestión del ADN genómico con una enzima de restricción y su fraccionamiento mediante electroforesis en gel de agarosa. Empleando la técnica de *Southern blot*, se pueden detectar múltiples minisatélites simultáneamente mediante hibridación con una sonda de secuencia homóloga a la del minisatélite marcada radiactivamente (*Figura 25*). Se obtienen así perfiles de bandas de ADN, denominados huellas dactilares (*fingerprint*), que contienen una gran cantidad de información genética (O'Reilly y Wright, 1995).

La principal ventaja de los marcadores multilocus es que las sondas pueden producir hibridaciones cruzadas entre distintos taxones (Georges y col., 1988). En consecuencia, una única sonda se puede utilizar para identificar individuos genéticamente distintos.

La técnica de *Multilocus minisatellite DNA fingerprinting* se ha empleado en estudios de poblaciones de barbo (*Barbus barbus*) (Castelli y col., 1990), bacalao (*Gadus morhua*) (Dahle, 1996), diversas especies de salmón como *Oncorhynchus tshawytscha* (Stevens y col., 1993), *Salmo salar* (Bentzen y Wright, 1993; Mjølnerød y col., 1997) y *Oncorhynchus kitsutch* (Miller y col., 1996), y en el estudio de poblaciones de trucha (*Salmo trutta*) (Prodöhl y col., 1992, 1997).

El estudio de minisatélites mediante la técnica de *Multilocus minisatellite DNA fingerprinting* presenta los siguientes inconvenientes (O'Reilly y Wright, 1995):

- No es posible conocer el número de *loci* examinados ni el lugar que éstos ocupan en el cromosoma.
- Estos marcadores altamente polimórficos son muy apropiados para el análisis de paternidad y en medicina forense, pero son inadecuados para muchos estudios genéticos de poblaciones debido a la incapacidad de asignar un *locus* específico a las bandas observadas.
- En ocasiones los resultados no son reproducibles.
- Esta metodología resulta menos sensible (se requiere una gran cantidad de ADN de partida), más laboriosa y más cara que los métodos basados en la amplificación por PCR, los cuales permiten visualizar la variación alélica en determinados *loci* de mini o microsatélites.

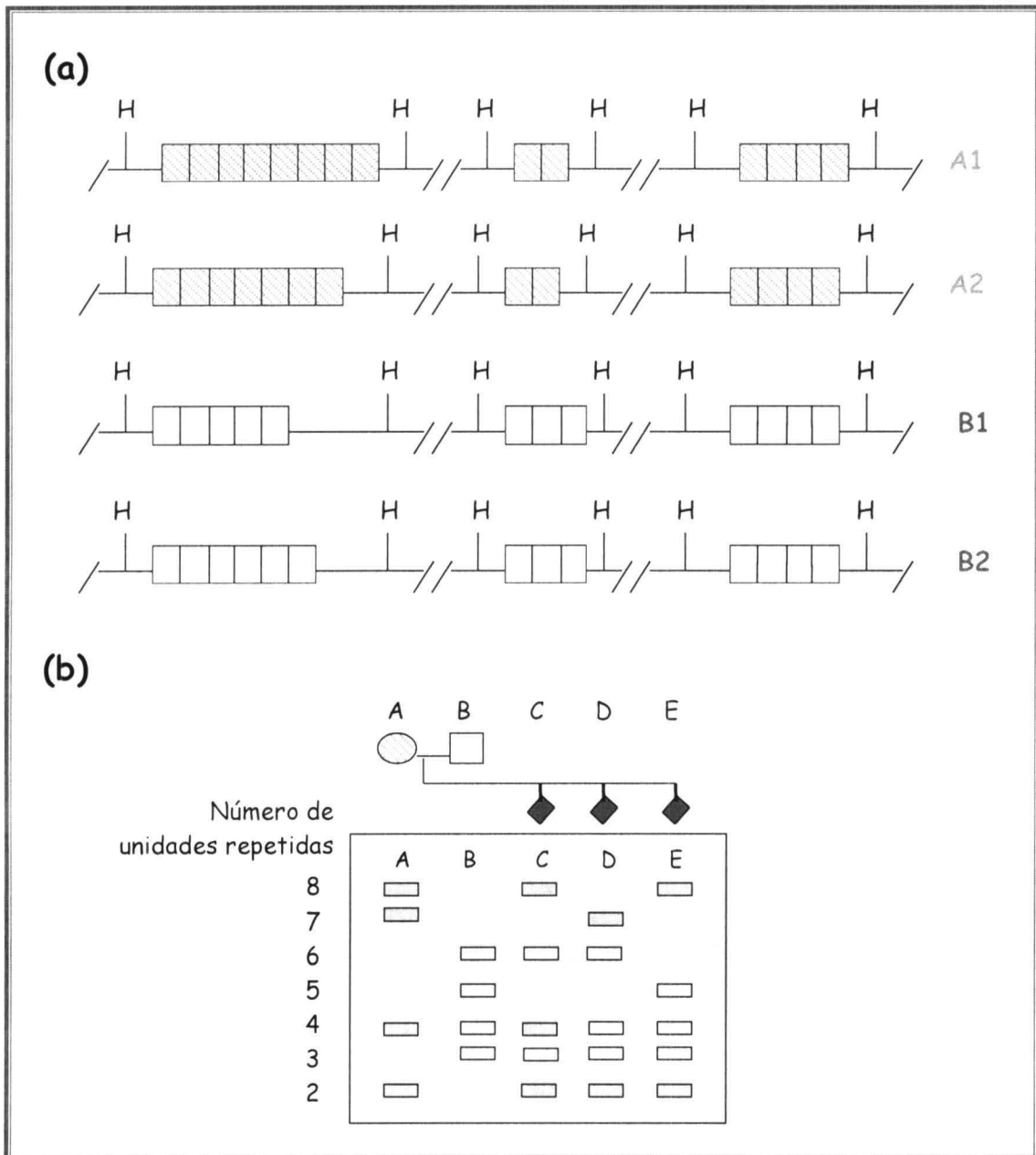


Figura 25. Técnica de *multilocus minisatellite DNA fingerprinting*. (a) A1, A2 y B1, B2 muestran la organización de tres *loci* de un minisatélite en cromosomas homólogos de los individuos A y B respectivamente. , unidades repetidas del minisatélite, (b) El ADN genómico de los dos padres (A y B) y de los hijos (C,D,E) se digiere con una enzima de restricción y se separa mediante electroforesis en gel de agarosa. H= diana de restricción de la enzima. Las bandas de ADN se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante la técnica de *Southern blot*. La hibridación con una sonda de secuencia similar al minisatélite marcada radioactivamente, permite detectar simultáneamente varios *loci*. Los hijos heredan un alelo de los padres en cada uno de los *loci* (O'Reilly y Wright, 1995).

Por ello, en los últimos años se ha centrado la atención en el estudio, en un solo *locus*, tanto de minisatélites como de microsatélites. De manera conjunta, se han denominado VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeated sequences*) (Ferguson y col., 1995).

Análisis de un *locus*

Existen dos técnicas diferentes para el análisis de los VNTRs en poblaciones de pescado y marisco. La técnica de *Single locus DNA fingerprinting*, empleada en minisatélites, similar a la técnica *Multilocus minisatellite DNA fingerprinting* pero se emplean sondas específicas para un determinado *locus*. La otra técnica, empleada fundamentalmente en microsatélites, consiste en el diseño de cebadores específicos, basados en las regiones que flanquean las secuencias repetitivas, que permiten su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Jeffreys y col., 1994), por lo que es imprescindible conocer la secuencia de esta zona. Los productos de PCR se visualizan mediante electroforesis (Figura 26).

Estas técnicas son más sencillas que las basadas en el *Southern blot*, pero tienen el inconveniente que no se pueden aplicar para amplificar fragmentos mayores de 4 o 5 Kb.

El desarrollo de ambas técnicas requiere el aislamiento y clonación de minisatélites o microsatélites específicos de un *locus*. No obstante, esta técnica tiene una serie de ventajas frente a la técnica que utiliza marcadores genéticos *multi/locus*:

- Los perfiles de las bandas son menos complejos y es poco probable la comigración de alelos de *loci* no homólogos.
- Como las bandas se atribuyen a cada *locus*, se puede estimar la frecuencia de los alelos.
- Utilizando estándares de alelos se pueden comparar muestras problema en un gel.

Entre las limitaciones de los marcadores *uni/locus* conviene señalar la complejidad de los mecanismos de mutación que generan variación en algunos minisatélites, entre los que se incluyen delecciones, duplicaciones intra-alélicas y recombinación inter-alélica (Wright, 1993).

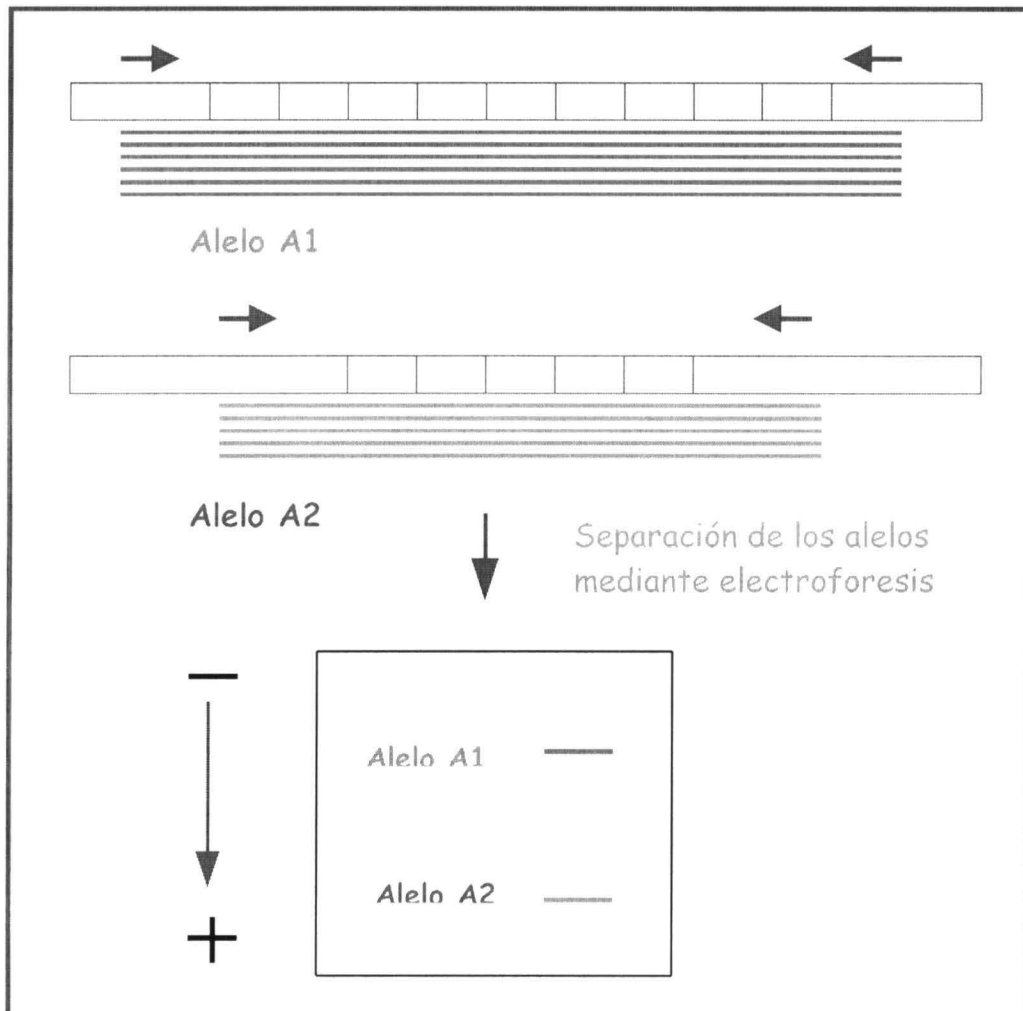


Figura 26. Amplificación de un microsatélite mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados (→, ←) son complementarios a las regiones que flanquean las secuencias repetitivas (□). Los productos de la amplificación, cuyo tamaño depende del número de unidades repetitivas (□) que contenga el microsatélite, se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. En caso de individuos homocigotos sólo aparecerá una banda, mientras que en individuos heterocigotos se observan dos bandas.

Minisatélites

El análisis de minisatélites mediante la técnica de *Single locus DNA fingerprinting* se ha utilizado fundamentalmente en el estudio de la variabilidad genética de poblaciones de pescado, sobre todo en especies pertenecientes a la familia *Salmonidae*.

Bentzen y Wright (1993), identificaron la secuencia de nucleótidos del minisatélite *SsaI* del salmón atlántico que contiene 16 pares de bases repetidas. La sonda *SsaI* desarrollada para el salmón atlántico se ha utilizado también para obtener perfiles específicos en otros salmónidos como el salmón keta (Taylor y col., 1994b).

Harris y Wright (1995), analizaron dos minisatélites aislados a partir del genoma de un cíclido (*Oreochromis niloticus*) en diversas especies de cíclidos (*O. aureus*, *Tilapia zillii*, etc.) y de peces de otras familias (*Salmo salar*), obteniendo variaciones en los perfiles de bandas, a nivel de individuo y de especie.

Taggart y Ferguson (1990) y Mjølnerød y col. (1997), utilizaron la técnica de *Single locus DNA fingerprinting* para estudiar las variaciones genéticas en diversas poblaciones de salmón (*Salmo salar*). La escasa variabilidad genética en estas poblaciones, había impedido la utilización de otro tipo de marcadores genéticos.

Prodöhl y col. (1997), estudiaron la variabilidad genética de dos especies cercanas de trucha (*Salmo trutta*) del noroeste de Escocia, mediante la técnica de *Single locus DNA fingerprinting*. No encontraron variabilidad genética entre los individuos de las poblaciones estudiadas con ninguna de las 8 sondas empleadas. Estos autores tampoco habían encontrado variabilidad utilizando el ADN mitocondrial (RFLP), ni con la técnica de *Multilocus DNA fingerprinting*.

La técnica de PCR apenas se ha empleado en la amplificación de minisatélites, ya que el tamaño de éstos dificulta en muchos casos su amplificación (O'Reilly y Wright, 1995). Tan sólo Galvin y col. (1995), utilizaron los cebadores diseñados a partir de la secuencia de un minisatélite de merluza (*Merlangius merlangus*) para amplificar por PCR un minisatélite específico de un solo *locus* en bacalao (*Gadus morhua*) y examinar la variabilidad genética de cuatro poblaciones de esta especie.

Microsatélites

Los microsatélites, debido a su tamaño, se pueden amplificar fácilmente mediante la técnica de PCR. Además, las zonas que flanquean muchos de los microsatélites estudiados son muy conservadas entre especies pertenecientes a la misma familia e incluso al mismo género. Esto permite que los cebadores empleados para amplificar un microsatélite en una especie, se puedan emplear también en otras especies (McConnel y col., 1995). Gracias a estas importantes ventajas, los microsatélites son las secuencias repetitivas del ADN cromosómico más utilizadas en la actualidad (O'Reilly y Wright, 1995).

Se han diseñado un gran número de cebadores para la amplificación de microsatélites en especies de pescado de interés comercial como el salmón (*Salmo salar*) (McConnel y col., 1995; Fontaine y col., 1997; Beacham y Dempson, 1998; King y col., 2001), la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Estoup y col., 1993; Morris y col., 1996; O'Connell y col., 1997), el bacalao (*Gadus morhua*) (Brooker y col., 1994; Ruzzante y col., 1997), especies del género *Sebastes* (Wimberger y col., 1999), pescados cíclidos como la especie *Oreochromis niloticus* (Kocher y col., 1998), entre otras muchas especies.

Además también se han estudiado los microsatélites en especies de crustáceos como el camarón (*Penaeus vannamei*) (Bagshaw y Buckholt, 1997) y en moluscos bivalvos como la vieira (*Placopecten magellanicus*) (Gjetvaj y col., 1997), *Anadara trapezia* (Nassif y Mackinlay, 1996) y la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) (McGoldrick y col., 2000). En todos los casos, la amplificación de los microsatélites ha permitido analizar la variabilidad genética de las poblaciones analizadas.

Capítulo III

MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. MATERIAL

III.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.1.1. MUESTRAS DE ALMEJAS

En este trabajo se utilizaron muestras de almejas procedentes de cuatro especies: almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja japonesa o italiana (*Ruditapes philippinarum*), almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*).

Todas las muestras de almejas se adquirieron sin procesar:

- Los ejemplares frescos de almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*) procedían de diversas pescaderías ubicadas en la Comunidad Autónoma de Madrid.
- Las muestras frescas de almeja rubia (*Venerupis rhomboides*) se obtuvieron en el mercado central Mercamadrid, ubicado en Madrid capital.

Cada uno de los individuos de las cuatro especies de almejas estudiadas en este trabajo se identificó previamente atendiendo a sus características morfológicas. Para ello se utilizó la guía de mariscos y especies afines (Lotina, 1992), así como la guía para la identificación de mariscos de Galicia (Fernández, 1995).

Una vez identificada la especie de procedencia de cada una de las muestras, se procedió a la separación de las almejas de sus conchas. Para ello se utilizaron cuchillas estériles y guantes, a fin de no contaminar las muestras. Las muestras de almejas no utilizadas inmediatamente, se conservaron a -85°C para su uso posterior.

III.1.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la obtención de anticuerpos policlonales se emplearon 4 lotes de 2 conejos machos blancos de la raza Nueva Zelanda, de 3-3,5 Kg de peso. Para la obtención de anticuerpos monoclonales se emplearon 2 lotes de 4 ratones hembras de la estirpe Balb/c, de 6 semanas de edad y 20-25 g de peso. Tanto los conejos como los ratones se mantuvieron en el Centro de Asistencia a la Investigación

“Animalario de la Universidad Complutense”, alimentados con dieta de mantenimiento para animales de experimentación y agua potable *ad libitum*.

III.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Las pesadas ordinarias se efectuaron en una balanza monoplato “AND” mod. EW-600A. Para las pesadas de precisión se utilizó la balanza analítica “AND” mod. ER-120A.

Para la preparación de los tampones y disoluciones acuosas se empleó agua destilada, obtenida en un aparato de filtración “Millipore” mod. Elix 3 y agua bidestilada, obtenida en un destilador “Nanopure” mod. Barnstead. Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro “Methohm” mod. 654.

Los tampones se disolvieron mediante agitación electromagnética y en algunos casos aplicando calor, con placas “Nuova II” mod. Thermolyne. Los agitadores de tubos empleados fueron “Heidolph” mod. REAX 2.000.

Las incubaciones que requerían un control preciso de la temperatura se efectuaron en un baño de agua termostatzado “Grant” mod. Y14 y en una estufa “Heraeus” mod. KB-500. Las incubaciones en agitación se realizaron en un incubador-agitador orbital “Lab-line” mod. 35.271.

Para la agitación de las muestras durante toda la noche, con el método de extracción de ADN de Bagshaw (1991), se utilizó un agitador “Selecta” mod. Rotaterm.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada “Sorvall” mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA. Para centrifugar pequeños volúmenes de muestra se utilizaron centrífugas “Heraeus” de los siguientes modelos: Biofuge A, equipada con rotor tipo 1.220; Megafuge 1.0, equipada con rotor tipo 2.150 y Biofuge 15R equipada con rotor tipo HFA 3.042.

Las diálisis de las muestras se efectuaron con membranas tubulares “Serva” mod. 27/32.

Las filtraciones de los tampones se realizaron con filtros “Millipore” mod. HATF, de 0,45 μm y mod. GVWP, de 0,22 μm .

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz UV-VIS "Hitachi" mod. U-2.000.

Las muestras de almejas se homogeneizaron utilizando un triturador "Polytron" mod. PCU. Para la filtración de los homogeneizados se utilizó un aspirador de vacío "Eyela" mod. A-3S.

Las liofilizaciones se realizaron en un liofilizador "Terruzzi-Melvisa" mod. TP3, dotado de equipo de registro, dispositivo de termovacío y programador.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones congeladores "Sanyo" mod. MDF-392, mantenidos a $-85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y "Kelvinator" mod. ACK-55, mantenidos a $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, así como en un frigorífico "Kelvinator" mod. AKR-20 y en un armario frigorífico "Kelvinator", mantenidos a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para la amplificación de fragmentos génicos de interés (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) se utilizó un termociclador "Techne" mod. Progene, equipado con tapa calefactora.

Las electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizaron en cubetas de electroforesis horizontales para ácidos nucleicos "Gibco BRL" mod. HORIZON 58 y "Bio-Rad" mod. Sub-Cell GT. Se emplearon fuentes de alimentación "Gibco BRL" mod. 250 Power Supply y "Bio-Rad" mod. Power Pac 300.

La visualización de los fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando un transiluminador de luz ultravioleta "Espectroline" mod. TL-312A y un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de documentación de imágenes "BioRad" mod. Geldoc 1.000 UV.

Todo el material de vidrio y plástico que se empleó para el estudio con ARN fue tratado con cloroformo, las cubetas de electroforesis horizontales fueron tratadas con Rnase Erase (Bio 101, Inc.), y en la preparación de todos los tampones y disoluciones acuosas se empleó DEPC-treated water (Bio 101, Inc.).

Las electroforesis de los ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida se realizaron en la unidad de separación del sistema automatizado de electroforesis "Pharmacia LKB" mod. PhastSystem™. Para la tinción de los geles se utilizó la unidad de tinción de este mismo aparato.



Todas las manipulaciones tanto de material genético como los medios de cultivos celulares se efectuaron en una campana de flujo laminar “Telstar” mod. AV-100, equipada con lámpara de luz ultravioleta.

En las técnicas inmunoenzimáticas se utilizaron placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos “Nunc” mod. Maxisorp y viales con paletas “Nunc” mod. DK 4.000. La agitación de las placas se llevó a cabo en agitadores de placas de ELISA “Wallac” mod. 1.296-001 Delfia Plateshake. Las medidas de absorbancia se realizaron en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA “Labsystems” mod. iEMS Reader MF.

Las células de mieloma se conservaron a $-85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un arcón congelador “Sanyo” mod. MDF-392. Las incubaciones de las células de mieloma e hibridomas se realizaron en una estufa “Heraeus” mod. 6.000 a 37°C con una concentración de CO_2 del 5%. El control del crecimiento celular y los recuentos, se realizaron con un microscopio “Nikon” mod. TMS-F.

Se emplearon micropipetas automáticas “Labsystems” mod. Finnpipette de 0,5-10 μL , de 5-40 μL , de 40-200 μL , de 200-1.000 μL y de 1-5 mL. También se utilizaron pipetas multicanal “Labsystems” mod. Finnpipette de 40-200 μL y una pipeta eléctrica “Biohit” mod. Proline[®] Midi.

Como material general de laboratorio se utilizaron tubos de microcentrífuga tipo eppendorf, viales estériles, pipetas pasteur, vasos de precipitados, matraces erlenmeyer, matraces aforados, agitadores, mecheros de gas, termómetros, jeringuillas, hojas de bisturí, etc. El material de vidrio empleado fue siempre de tipo “Pyrex”.

La esterilización del material utilizado en este trabajo se realizó en un autoclave “Selecta” mod. Autester G, utilizando cintas de papel indicador para comprobar la efectividad del proceso. La esterilización de material de vidrio se realizó por calor seco en una estufa de aire forzado “Heraeus” mod. KFTU-K.

III.1.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos químicos y biológicos utilizados en los experimentos descritos en este trabajo fueron suministrados por los siguientes laboratorios: “Appligene-

Oncor” (Heidelberg, Alemania), “Bio 101 Inc” (La Jolla, California, EE.UU.), “BioRad” (Hercules, EE.UU.), “Biotools” (Madrid, España), “BioVentures” (Tennessee, EE.UU.), “Cruachem” (Glasgow, Reino Unido), “Dako” (Glostrup, Dinamarca), “Difco” (Michigan, EE.UU.), “Ecogen” (Barcelona, España), “Finnzymes Oy” (Espoo, Finlandia), “Fluka” (Buchs, Suiza), “Gibco BRL” (Maryland, EE.UU.), “Hispanlab” (Torrejón, España), “Isogen” (Utrecht, Holanda), “Merck” (Darmstadt, Alemania), “New England Biolabs” (Beverly, EE.UU.), “Panreac” (Barcelona, España), “Pharmacia Biotech” (Uppsala, Suecia), “Qiagen GmbH” (Hilden, Alemania), “Roche” (Basilea, Suiza) y “Sigma” (St. Louis, EE.UU.).

En las técnicas genéticas se emplearon reactivos con calidad *para biología molecular* y en las técnicas inmunológicas se utilizaron reactivos con calidad *para análisis*.

III.2. MÉTODOS EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS GENÉTICAS

En la *Figura 27* se muestra un esquema de la metodología desarrollada en este trabajo para la identificación genética a partir de ADN de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*), y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*). A continuación se describe detalladamente cada uno de los métodos empleados.

III.2.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS

El primer paso necesario para llevar a cabo la identificación genética de la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), la almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y la almeja rubia (*Venerupis rhomboides*), fue la selección de marcadores.

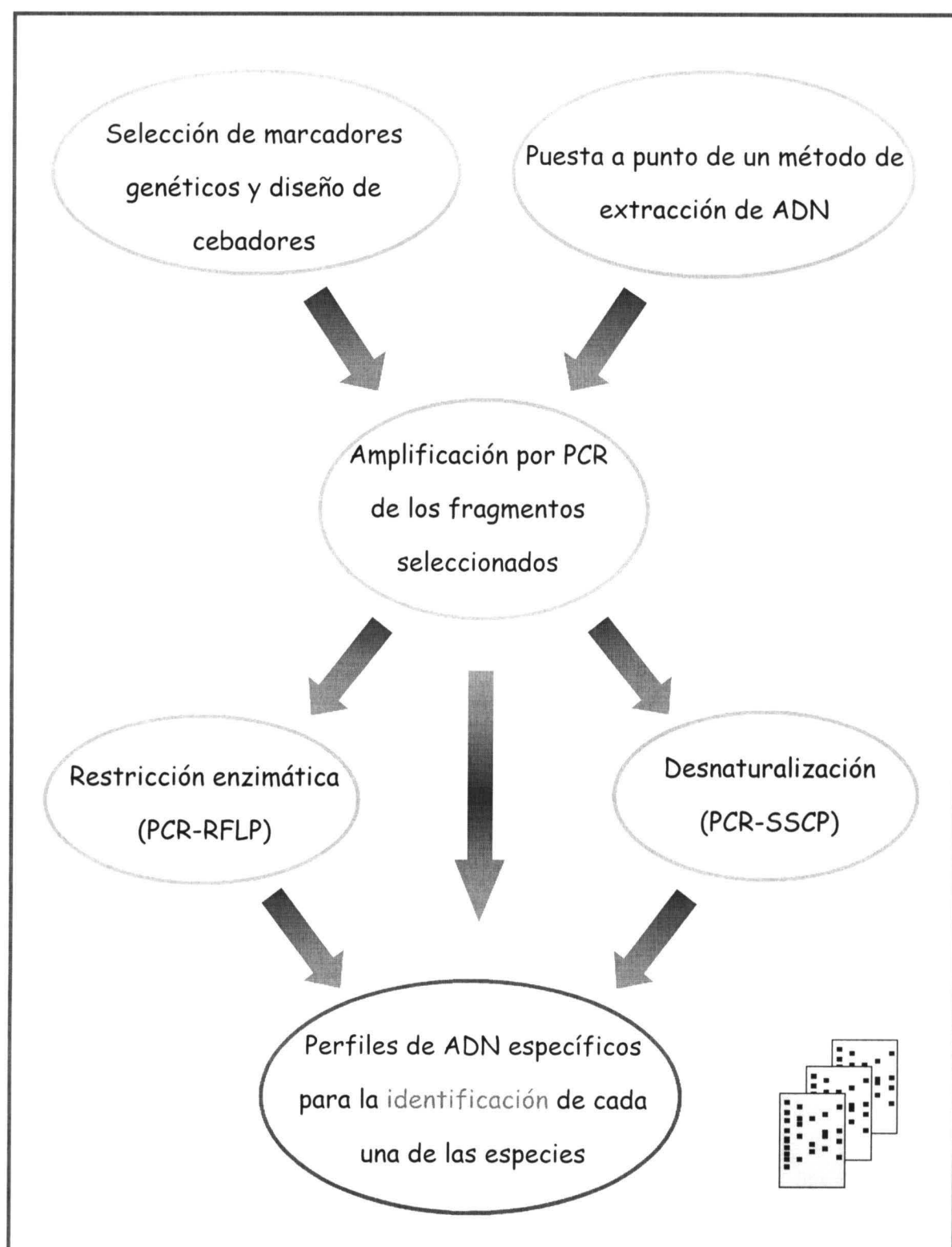


Figura 27. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación genética de almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*), almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*).

Se realizó una búsqueda bibliográfica de secuencias de genes de estas especies de almejas, empleando para ello las bases de datos *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, EE.UU.) y *EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*, Heidelberg, Alemania), no encontrándose secuencias génicas de ninguna de ellas. Por consiguiente, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de secuencias de genes estudiados en otras especies de moluscos que pudieran resultar adecuados para lograr el objetivo que nos habíamos marcado en este trabajo. Se seleccionaron genes con regiones conservadas, para poder amplificar el mismo fragmento de ADN en todas las especies, pero a la vez con un grado de mutación suficiente para poder encontrar diferencias en las secuencias que permitieran su diferenciación.

Finalmente, se eligieron tres genes nucleares, el gen que codifica la proteína α -actina, el espaciador interno de la transcripción (ITS) y el gen que codifica la enzima arginina quinasa, y el gen mitocondrial que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico (ARNr).

III.2.2. DISEÑO DE CEBADORES

Una vez seleccionados los marcadores genéticos que pretendíamos utilizar, se procedió al diseño de cebadores que permitieran la amplificación de cada uno de ellos. A continuación se exponen los cebadores empleados en cada gen.

III.2.2.1. GEN NUCLEAR α -ACTINA

III.2.2.1.1. Cebadores act-2 y act-4

Se utilizaron dos cebadores diferentes:

Act-2: 5'-TAC CT(GC) ATG AAG ATC CTC ACT GAG-3'

(24 nucleótidos, $T_m = 66,6^\circ\text{C}$)

Act-4: 5'-TCC TGC TTG GTG ATC CAC ATC TG-3'

(23 nucleótidos, $T_m = 70^\circ\text{C}$)

Los cebadores act-2 y act-4 fueron diseñados por Watabe y col. (1995), para la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína muscular α -actina, basándose en las secuencias de la proteína α -actina humana y de varias

especies de animales como la rata, el ratón y el pollo. El tamaño del fragmento amplificado con estos cebadores fue de 521 pares de bases (pb).

III.2.2.1.2. Cebadores act-5 y act-6

Las secuencias de estos cebadores son:

Act-5: 5'-TTC GAG CAG GAA ATG GCC AC-3'

(20 nucleótidos, T_m= 62°C)

Act-6: 5'-TTC CAT ACC CAA GAA GGA TG-3'

(20 nucleótidos, T_m= 58°C)

Los oligonucleótidos act-5 y act-6 se diseñaron basándose en las secuencias de 521 pb del fragmento amplificado del gen α -actina en la almeja babosa, fina, italiana y rubia. Para ello se utilizó el programa PRIME del paquete informático GCG (*Genetic Computer Group*), versión 9.0 (Universidad de Wisconsin, Madison, EE.UU.) y el programa AMPLIFY (Engels, 1992). Las secuencias de los cebadores diseñados se compararon, mediante el programa FASTA del paquete informático GCG, con todas las secuencias de las bases de datos *GenBank* y *EMBL* con el fin de comprobar su concordancia con las secuencias disponibles en otras especies.

Los cebadores act-5 y act-6 permitieron la amplificación de un fragmento de 150 pb del gen α -actina de las almejas babosa, fina, italiana y rubia. Estos cuatro cebadores fueron sintetizados por la casa comercial CRUACHEM.

III.2.2.2. ESPACIADOR INTERNO DE LA TRANSCRIPCIÓN (ITS)

Para la amplificación del espaciador interno de la transcripción se emplearon dos cebadores diferentes:

ITS-1: 5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT G-3'

(19 nucleótidos, T_m= 66,8°C)

ITS-2: 5'-CTC GTC TGA TCT GAG GTC G-3'

(19 nucleótidos, T_m= 67,3°C)

Los cebadores ITS-1 e ITS-2 fueron diseñados por Heath y col. (1995), a partir de las secuencias del ADN ribosómico (ADNr) de especies de mejillón,

Mytilus spp. Los oligonucleótidos ITS-1 e ITS-2 hibridan en regiones conservadas de los genes 18S y 28S respectivamente, y por lo tanto se amplificaron las dos regiones del espaciador interno de la transcripción (ITS-1 e ITS-2) y la región conservada del gen 5,8S (Figura 28). La pareja de cebadores ITS-1 e ITS-2 permitió la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1.100 pb, cuya longitud exacta se confirmó tras la secuenciación de los productos de PCR.

La síntesis de los oligonucleótidos ITS-1 e ITS-2 la llevó a cabo la casa comercial CRUACHEM.

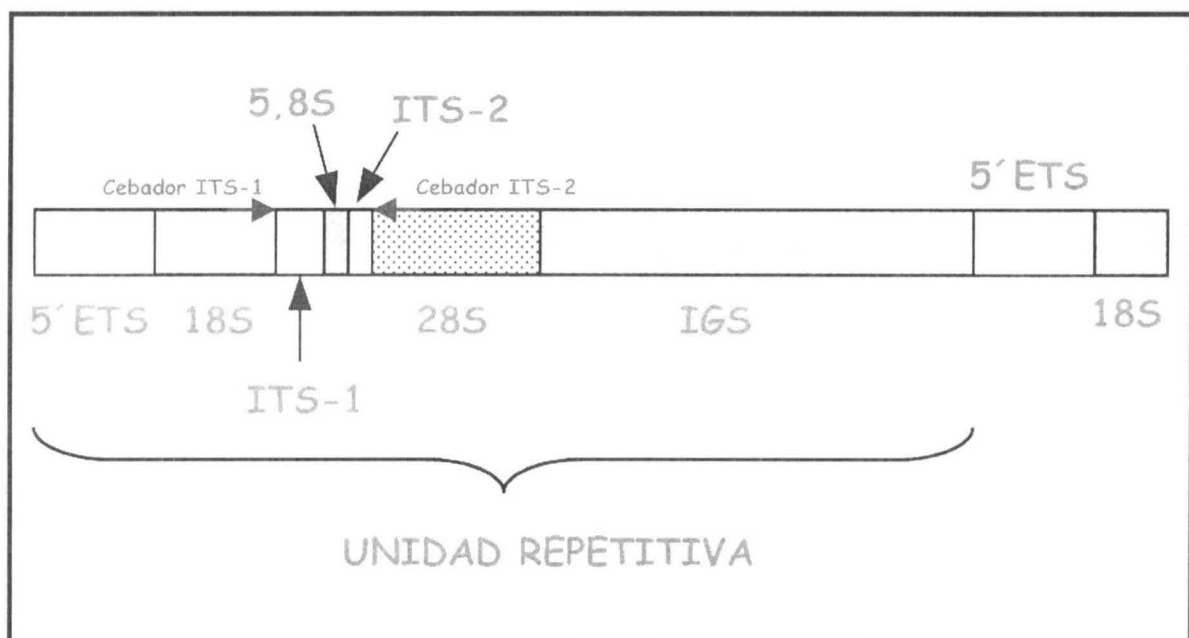


Figura 28. Estructura del ADN ribosómico, se muestra la localización de las regiones codificadoras (18S, 5,8S y 28S), los espaciadores internos de la transcripción (ITS-1 e ITS-2), los espaciadores externos de la transcripción (5'ETS) y la región espaciadora intergénica (IGS) (Zhuo y col., 1994). Se muestra en granate la posición de los cebadores ITS-1 (directo) e ITS-2 (inverso).

III.2.2.3. GEN MITOCONDRIAL 16S ARNr

Palumbi y col. (1991), diseñaron los cebadores 16SAR y 16SBR para amplificar un fragmento del gen mitocondrial 16S del ARNr. Las secuencias de nucleótidos de estos cebadores son:

16SAR: 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'

(20 nucleótidos, Tm= 59,1°C)

16SBR: 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'

(22 nucleótidos, T_m= 67,6°C)

Con los cebadores 16SAR y 16SBR se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb en la almeja babosa, fina, italiana y rubia, cuya longitud exacta se confirmó tras la secuenciación de los productos de PCR. La síntesis de los oligonucleótidos 16SAR y 16SBR la llevó a cabo la casa comercial PHARMACIA BIOTECH.

III.2.2.4. GEN ARGININA QUINASA

III.2.2.4.1. Cebadores AKrna y AKom

Para amplificar en las especies de almejas (babosa, fina, italiana y rubia) un fragmento de 300 pb del gen que codifica para la enzima arginina quinasa se empleó la pareja de cebadores AKrna y AKom. El cebador AKrna fue diseñado por Suzuki y Furukohri (1994), a partir de las secuencias de una región conservada de las enzimas fosfagen quinasa en varias especies de vertebrados e invertebrados. Para el diseño del cebador AKom, se buscaron las secuencias disponibles de este gen en las bases de datos *GenBank* y *EMBL*. A continuación, empleando los programas PRIME y AMPLIFY se diseñó este cebador.

Las secuencias de nucleótidos de estos cebadores son:

AKrna: 5' -GTN TGG RTN AAY GAR GAR GAY CA -3'

(23 nucleótidos, T_m= 65,8°C)

AKom: 5' - YRC TYT CRG WGT GYT CMC CGT G-3'

(22 nucleótidos, 64,1°C)

Siendo: M=A/C; N=A/C/G/T; R=A/G; W=A/T; Y=T/C;

La síntesis de los oligonucleótidos AKrna y AKom la llevó a cabo la casa comercial CRUACHEM.

III.2.2.4.2. Cebadores oligo-dT-adaptor y AKalm

El cebador oligo-dT-adaptor, fue diseñado por Suzuki y Furukohri (1994), para obtener la secuencia del extremo 3' del gen que codifica las enzimas fosfagen quinasa en invertebrados. Tras la secuenciación del fragmento de 300 pb del gen

que codifica para la enzima arginina quinasa en las cuatro especies de almejas, se diseñó el cebador AKalm, gracias a los programas PRIME y AMPLIFY, indicados anteriormente. Con esta pareja de cebadores se amplificaron fragmentos de ADN de aproximadamente 700 pb en las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia. Las secuencias de estos cebadores son:

AKalm: 5'- G(T/C)T ACC TTA CAT T(T/C)T GTC CAT C-3'

(22 nucleótidos, T_m= 54,1°C)

Oligo-dT-adaptor: 5'- GGA TTC GAA TTC CCC GGG(T₁₇) -3'

(35 nucleótidos, T_m= 76,1°C)

La síntesis de los oligonucleótidos oligo-dT-adaptor y AKalm la llevó a cabo la casa comercial PHARMACIA BIOTECH.

III.2.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

III.2.3.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se realizó a partir del tejido muscular del pie o en algunos casos a partir de toda la muestra de almeja de las especies objeto de estudio: almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*). El principal problema que se presenta al extraer ADN de moluscos, suele ser la presencia, junto con el ADN, de compuestos inhibidores que impiden la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Wilson, 1997; Fernández y col., 2000a; 2000c), lo que obliga a poner a punto métodos de extracción que eviten la aparición de estos compuestos en las preparaciones de ADN. Por esta razón, se utilizaron diversos métodos de extracción del ADN recogidos en la bibliografía (DeSalle y col., 1993; Borgo y col., 1996; Jones y col., 1993; Patwary y col., 1996; y Bagshaw, 1991), con el fin de seleccionar el protocolo más adecuado al objetivo del trabajo. Las muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia, se analizaron en todos los métodos por duplicado. Una vez repetido cada protocolo al menos 3 veces, se estudiaron los resultados obtenidos con cada uno de ellos, seleccionándose finalmente el método de extracción del ADN descrito por Bagshaw, en 1991.

Además, se han utilizado dos *kit* comerciales para la extracción del ADN: *QIAamp tissue kit* (Qiagen) y *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega). Se analizaron también los resultados obtenidos con cada uno de ellos seleccionándose el método de extracción *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* como el más adecuado. A continuación se describe detalladamente cada uno de los protocolos de extracción del ADN utilizados en este trabajo.

III.2.3.1.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DESALLE y col. (1993)

Este método, puesto a punto por DeSalle y col. (1993), permite extraer ADN total a partir de tejidos animales. Para la extracción del ADN de las muestras de almejas, se homogeneizaron 100 mg de tejido muscular del pie en 500 μ L del tampón de extracción TSM (Tris 0,2 M; EDTA 0,1 M; SDS 1%) y 6 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron toda la noche a 55°C en agitación. Después de la incubación, los tubos se colocaron en hielo durante 30 min, se centrifugaron a 11.500 g durante 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. El ADN se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y otra vez con un volumen igual de cloroformo. Seguidamente, el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol a -20°C, durante 30 min. Se centrifugó a 15.000 g 10 min, se descartó el etanol y el precipitado de ADN se resuspendió en 500 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM). A continuación se añadieron 50 μ L de acetato amónico 50 mM y 1 mL de etanol absoluto para precipitar el ADN por segunda vez. Tras invertir varias veces el tubo, se dejó reposar 20 min a -20°C. Finalmente, se centrifugó a 15.000 g durante 10 min, se descartó el etanol y se dejó secar el sedimento de ADN, que se resuspendió posteriormente en 100-150 μ L de agua bidestilada estéril.

III.2.3.1.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BORGIO y col. (1996)

Este método, desarrollado por Borgo y col. (1996), para el aislamiento del ADN mitocondrial a partir de dos especies de caracol *Helix pomatia* y *Helix lucorum*, se realizó como se describe a continuación: 50 mg of tejido muscular del

pie se homogeneizaron con 500 μ L de tampón de lisis TEK (Tris-HCl 0,1 M; EDTA 0,02 M; KCl 1,5%, pH 7,8) y 6 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). La digestión se desarrolló a 55°C, en agitación, durante 6 h. Posteriormente, las mitocondrias se lisaron con dos volúmenes de tampón SDS alcalino (NaOH 0,2 M; SDS 1%) y se mantuvieron durante 10 min en hielo. A continuación, se añadió al lisado la mitad del volumen de acetato potásico 5 M (pH 4,8), y se mantuvo en hielo durante 10 min. Después se centrifugaron las muestras a 9.000 g durante 10 min, se añadió el sobrenadante a otro tubo que contenía un volumen igual de fenol saturado en agua y equilibrado a pH 8 (Appligene), y se mezclaron bien las dos fases agitando vigorosamente durante 20 s. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 11.000 g durante 5 min y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. La extracción con fenol se realizó tres veces. Seguidamente, el sobrenadante se añadió a un tubo que contenía cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y se invirtieron los tubos mediante una agitación lenta, durante al menos 10 min. A continuación, los tubos se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min, obteniéndose entonces dos fases bien separadas: una fase superior acuosa y una fase orgánica inferior. La fase acuosa se recogió con una pipeta, utilizando una punta de boca ancha (3 mm) para evitar dañar la molécula de ADN, y se depositó en un tubo limpio junto con un volumen de isopropanol y 0,1 volumen de acetato potásico 5 M, y se dejaron precipitar las muestras a -20°C durante toda la noche. Tras la precipitación de los ácidos nucleicos, se centrifugaron los tubos a 12.000 g durante 10 min y, tras decantar el isopropanol y el acetato potásico, el sedimento se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el sedimento lavado se dejó secar a temperatura ambiente y el ADN se resuspendió en 30 μ L de agua bidestilada estéril.

III.2.3.1.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE JONES y col. (1993).

El protocolo de extracción que se describe a continuación fue desarrollado por Jones y col. (1993), para el aislamiento de ADN de microorganismos patógenos en ostras. Para ello, 5 g de cada especie de almeja se homogeneizaron con 45 mL de tampón PBS (NaCl 0,14 M; KH_2PO_4 1,5 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8,1 mM; KCl 2,7 mM, pH 7,2). Posteriormente, 1 mL de homogeneizado se lavó con 1 mL de tampón PBS, se agitó y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con otro mL de tampón PBS, se mezcló bien

el contenido de los tubos y se volvió a centrifugar. A continuación, se le añadieron al sedimento 25 μL de isotiocianato de guanidina (GITC) 5,9 M, se mezcló vigorosamente durante 20 s y se incubó a 60°C durante 90 min. Después, se diluyó la suspensión hasta alcanzar una concentración de isotiocianato de guanidina de 0,3 M, añadiendo para ello 0,2 mL de InstaGeneTM Matrix (Bio-Rad) y 0,26 mL de agua bidestilada estéril, y se mezcló vigorosamente. Posteriormente, se hirvieron las muestras en un baño de agua durante 8 min. A continuación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se añadieron 31,3 μL de acetato sódico 5 M, se centrifugaron a 12.000 g 15 min a 4°C, y la fase superior se transfirió a tubos limpios. Posteriormente, los ácidos nucleicos se extrajeron dos veces con un volumen igual de cloroformo, centrifugando a 12.000 g durante 10 min y separando la fase superior con mucho cuidado. La fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol frío al 98% durante al menos 1 h a -20°C ó 20 min a -85°C. Tras centrifugar a 11.000 g durante 30 min a 4°C, se secó el sedimento a temperatura ambiente y se diluyó en 50 μL de agua bidestilada estéril.

III.2.3.1.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PATWARY y col. (1996)

Patwary y col. (1996), pusieron a punto este método de extracción con el fin de extraer ADN de tejido muscular de la vieira (*Placopecten magellanicus*). Este método se modificó para extraer ADN a partir de las muestras de almejas. Para ello, se homogeneizó cada almeja con 10 volúmenes de tampón PBS y posteriormente 1 mL de homogeneizado se lavó dos veces con 1 mL de tampón PBS como se ha descrito anteriormente para el método de Jones y col. (1993). Después, el sedimento se homogeneizó con 500 μL de tampón de lisis (sarcosil 2%; NaEDTA 0,5 M; NaCl 0,1 M; Tris 0,02 M, pH 7,6) que contenía 6 μL de proteinasa K (20 mg/mL). Tras agitar suavemente, la mezcla se incubó durante toda la noche en agitación a 55°C. Una vez terminada la lisis, las muestras se centrifugaron a 1.975 g durante 10 min. El sobrenadante, se transfirió a un tubo limpio y se precipitaron los ácidos nucleicos durante 1 hora a -20°C, añadiendo 2/3 del volumen de isopropanol frío. A continuación, se centrifugaron las muestras a 3.920 g durante 15 min, y el sedimento obtenido se secó al vacío y se resuspendió en 500 μL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) durante 30 min a 55°C.

Posteriormente, se añadieron 500 μ L de tampón de extracción [fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); Tris 0,1 M pH 7,5; β -mercaptoetanol 0,2%] y se mezclaron bien ambas fases. A continuación, se centrifugaron las muestras a 4.000 g durante 5 min. La fase superior (acuosa) se transfirió a un tubo nuevo, y se repitió la extracción. Tras mezclar bien y centrifugar, la fase superior se transfirió a un tubo limpio, al que se añadió un volumen igual de cloroformo-isoamiloalcohol (24:1), se agitó y se centrifugó. La fase superior se transfirió a otro tubo que contenía 1/3 del volumen de acetato amónico y 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%, para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos, y se mantuvo a -20°C durante al menos 1 h. A continuación, se centrifugó a 10.000 g durante 15 min y el sedimento se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el sedimento se secó a temperatura ambiente, y se disolvió el ADN con 100 μ L de tampón TE.

III.2.3.1.5. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BAGSHAW (1991)

Este método, fue puesto a punto por Bagshaw (1991), para la extracción del ADN a partir de tejidos de crustáceos. Sin embargo, el protocolo se modificó para permitir la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de almejas. Para ello, se homogeneizaron 0,5 g de tejido muscular del pie con 5 mL de tampón de extracción del ADN (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 0,1 M; EDTA 0,1 M; SDS 0,5%), que contenía 15 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). El homogeneizado se incubó en agitación a 55°C durante 6 h ó hasta que se completó la lisis. Se añadieron al lisado 5 mL de fenol saturado en agua y se mantuvo la mezcla en agitación oscilante a 1.500 r.p.m. durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min y la fase acuosa (superior) se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio con una pipeta de boca ancha. A continuación, a la fase acuosa (4 mL) se le añadieron 2 mL de fenol saturado en agua y 2 mL de cloroformo, y se mezcló lentamente a 1.500 r.p.m. durante al menos 1 h. La mezcla se centrifugó a 2.000 g durante 10 min, se transfirió la fase superior a un tubo limpio, y se le añadieron dos volúmenes de etanol al 98% a temperatura ambiente. Tras la precipitación, si se observaba la hebra del ADN, ésta se recogió con puntas estériles y se transfirió a otro tubo. Si no se observaba la hebra, se permitió la precipitación del ADN durante 1-2 h a temperatura ambiente, y se centrifugaron los tubos a 2.500 g durante 15 min. A continuación, el sedimento se lavó dos veces

con 5 mL de etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió con 2 mL de tampón TE durante 2 h a 4°C. Tras la disolución, se añadieron 2 mL de *solución A* (NaCl 1,4 M; Tris 0,2 M, pH 8) y 435 µL del *solución B* (Bromuro de cetiltrimetilamonio al 10%; NaCl 0,7 M), y se agitó la mezcla suavemente. Después, se añadieron 4,5 mL de cloroformo, se agitó suavemente la mezcla durante 10 min, se centrifugó a 2.500 g durante 10 min y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo limpio. Los ácidos nucleicos se extrajeron de nuevo con un volumen de cloroformo, se precipitaron con 5 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el ADN precipitado se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 150-300 µL de agua bidestilada estéril (Figura 29).

III.2.3.1.6. MÉTODO DE EXTRACCIÓN QIAamp TISSUE KIT

Este método se basa en la adsorción del ADN a una membrana de sílice. Dicha adsorción tiene lugar durante una breve centrifugación. Las condiciones salinas y de pH del lisado, aseguran que las proteínas y otros contaminantes, que pueden inhibir la PCR, no se retienen en la membrana. El protocolo descrito en el manual *QIAamp tissue kit Handbook* (Qiagen), se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con algunas modificaciones. Para la extracción a partir de tejido muscular del pie de las almejas, 25 mg del mismo se trocearon con bisturí estéril y se introdujeron en un tubo de centrífuga de 1,5 mL. Se añadieron 360 µL de tampón de lisis (ATL) y 20 µL de proteinasa K (10 mg/mL), y la mezcla se incubó a 55°C toda la noche en agitación. El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, se recogió el sobrenadante con una pipeta de boca ancha y se transfirió a un tubo limpio. A continuación, se añadieron 400 µL de tampón AL, se mezcló bien el contenido del tubo y la mezcla se incubó a 70°C durante 10 min. Tras la incubación, se añadieron 420 µL de etanol al 98%, se agitó el contenido y se transfirió a una columna de purificación *QIAamp spin column*, que previamente se introdujo en un tubo de centrífuga de 2 mL. Se centrifugó a 6.000 g durante 1 min, y se añadieron a la columna de purificación 500 µL de tampón de lavado (AW). A continuación, se centrifugó a 6.000 g durante 1 min y se repitió el lavado con 500 µL de tampón AW.

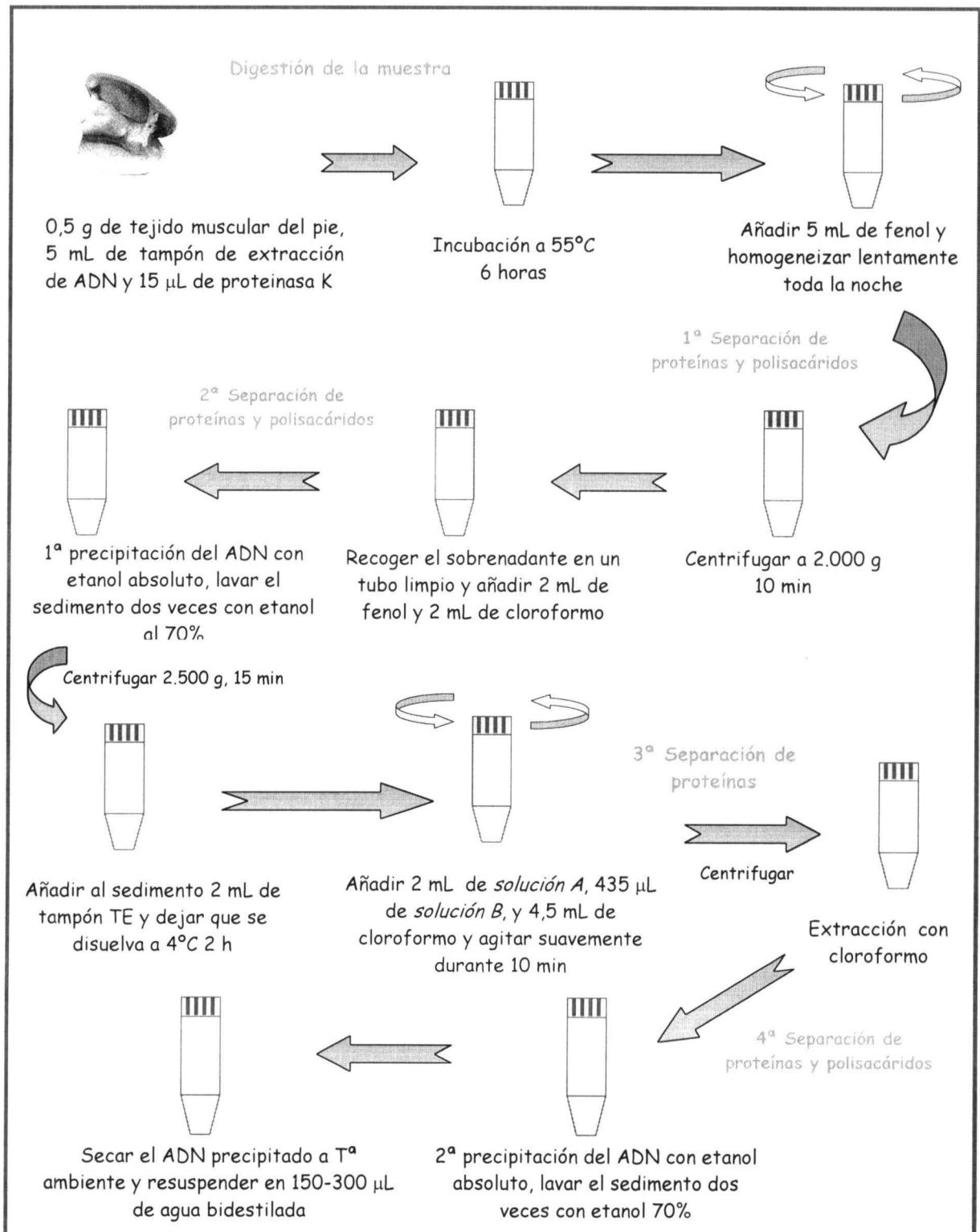


Figura 29. Método de extracción de ADN de Bagshaw (1991).

Tras centrifugar a 11.000 g durante 3 min para eliminar el tampón de lavado, se colocó la columna de purificación en un tubo de centrifuga limpio de 2 mL. Finalmente, para eluir el ADN, se añadieron 200 μ L de tampón AE, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifugó la columna de purificación a 6.000 g durante 1 min, y se recogió el ADN eluido en un tubo limpio.

III.2.3.1.7. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food

Este protocolo se basa en la unión de los ácidos nucleicos en solución a unas partículas paramagnéticas (*MagneSil[™] Paramagnetic Particles PMPs*), que se consideran como “la fase sólida móvil”. En este método de extracción se partió de 200 mg de pie de almeja a los que se añadieron 500 μ L de tampón de lisis A y 5 μ L de ARNasa A, se agitó la mezcla vigorosamente y se añadieron 250 μ L de tampón de lisis B. Todo ello se mezcló durante 10-15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadieron 750 μ L de *Precipitation Solution*, y se mezcló vigorosamente el contenido. Después, se centrifugó a 13.000 g durante 10 min para eliminar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL. Se añadieron al sobrenadante 50 μ L de *MagneSil[™] PMPs* y, tras agitar vigorosamente la mezcla, se añadieron 0,8 volúmenes de isopropanol. Se invirtió el tubo 10-15 veces, para mezclar bien el contenido, y la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se colocó el tubo durante 1 min en el separador de partículas magnéticas *MagneSpher[®]*, y se retiró el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta. Seguidamente, al tubo que contenía las partículas magnéticas se añadieron 250 μ L de tampón de lisis B. Se invirtió el tubo 2-3 veces para permitir una buena homogeneización del contenido y se colocó de nuevo en el separador *MagneSpher[®]* durante 1 min. Se retiró el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 70% para lavar el ADN y se situó en el separador *MagneSpher[®]*. Tras 1 min de espera, se eliminó el sobrenadante y se repitió tres veces el lavado con etanol. Tras descartar el etanol, se secaron las partículas magnéticas a temperatura ambiente durante 15-30 min, y se eluyó el ADN añadiendo 100 μ L de agua bidestilada estéril. Se agitó el contenido del tubo para facilitar la elución y se incubó a 65°C durante 5 min. Finalmente, se introdujo

de nuevo el tubo en el separador de partículas magnéticas durante 1 min y se recogió el ADN cuidadosamente con una pipeta, transfiriéndolo a un tubo limpio (Figura 30).

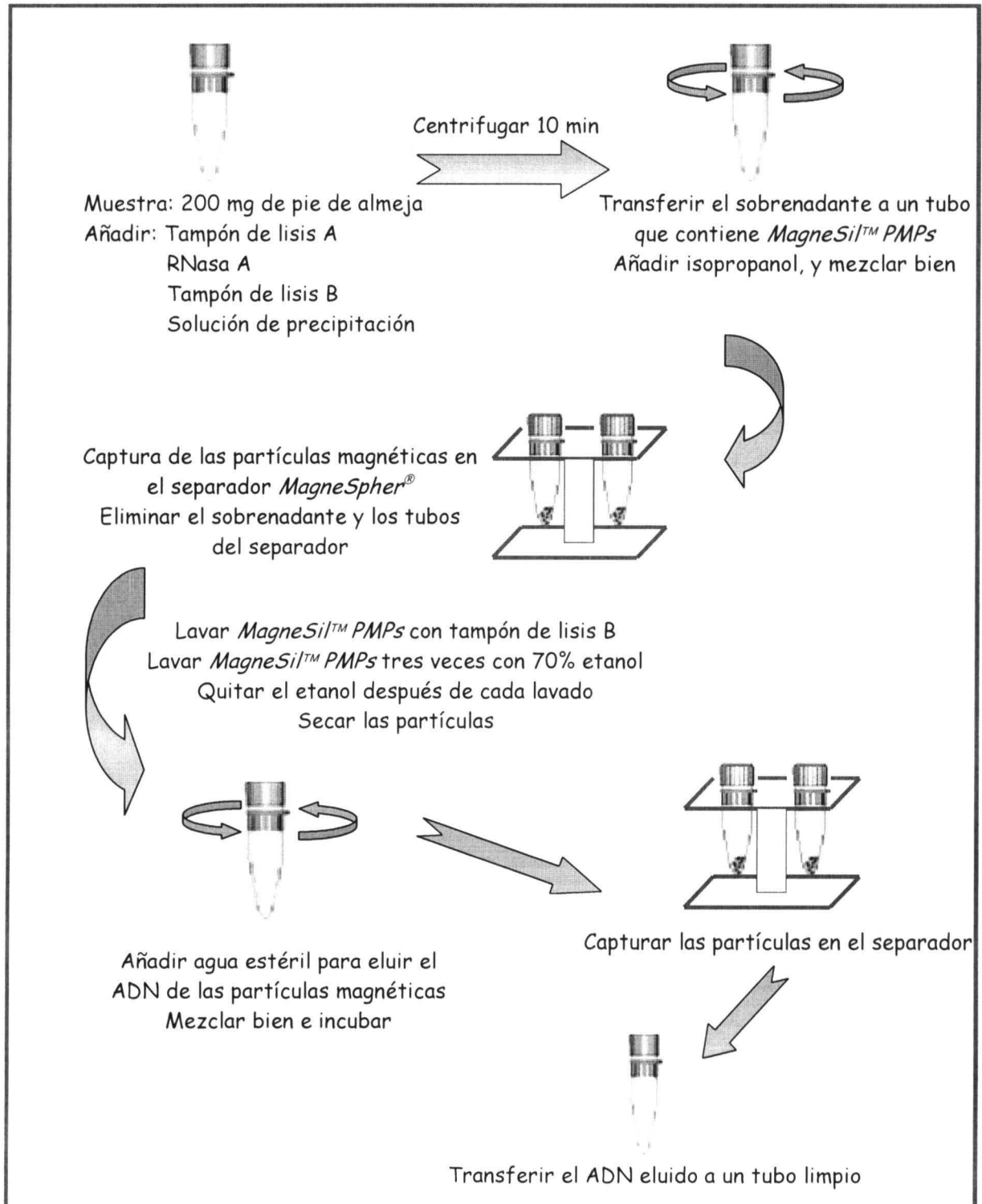


Figura 30. Método de extracción *Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega).

III.2.3.2. EXTRACCIÓN DEL ARN

En la *Figura 31* se muestra un esquema de la metodología desarrollada en este trabajo para la identificación genética de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*), y rubia (*Venerupis rhomboides*) a partir del ARN.

El primer paso, por lo tanto, es la puesta a punto de un método de extracción del ARN a partir del tejido de las cuatro especies de almejas objeto de estudio. A continuación se describen detalladamente los dos métodos empleados para conseguir dicho objetivo.

III.2.3.2.1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN ULTRASPEC™ RNA ISOLATION SYSTEM (BIOTECX)

Este método se basa en la extracción del ARN total a partir de tejidos animales, bacterias, plantas y levaduras. En este procedimiento, se emplean agentes desnaturalizantes como urea y solución salina de guanidina 14 M, así como fenol y detergentes, para el aislamiento del ARN total a partir de tejidos. Para ello, se utiliza el reactivo Ultraspec™ RNA, que permite extraer el ARN total de las muestras en menos de 1 h.

Para la extracción del ARN a partir del tejido muscular del pie de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, se siguieron las instrucciones del fabricante, pero con ligeras modificaciones. La homogeneización consistió en trocear 10 mg de tejido muscular con hojas de bisturí estériles y depositarlos en un tubo de centrifuga junto con 1 mL de solución Ultraspec™ RNA. Se mezcló bien el contenido y se incubó durante 15 min a 4°C, para que tuviera lugar la disociación completa de complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadieron 0,2 mL de cloroformo, se mezcló el contenido vigorosamente durante 20 s y se colocó en hielo 5 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se observaron dos fases: una fase orgánica inferior (el ADN y las proteínas suelen quedar en esta fase y en la interfase), y una fase acuosa superior, donde está el ARN disuelto. La fase superior se aspiró con una pipeta de boca ancha y se depositó en otro tubo junto con un volumen igual de isopropanol.

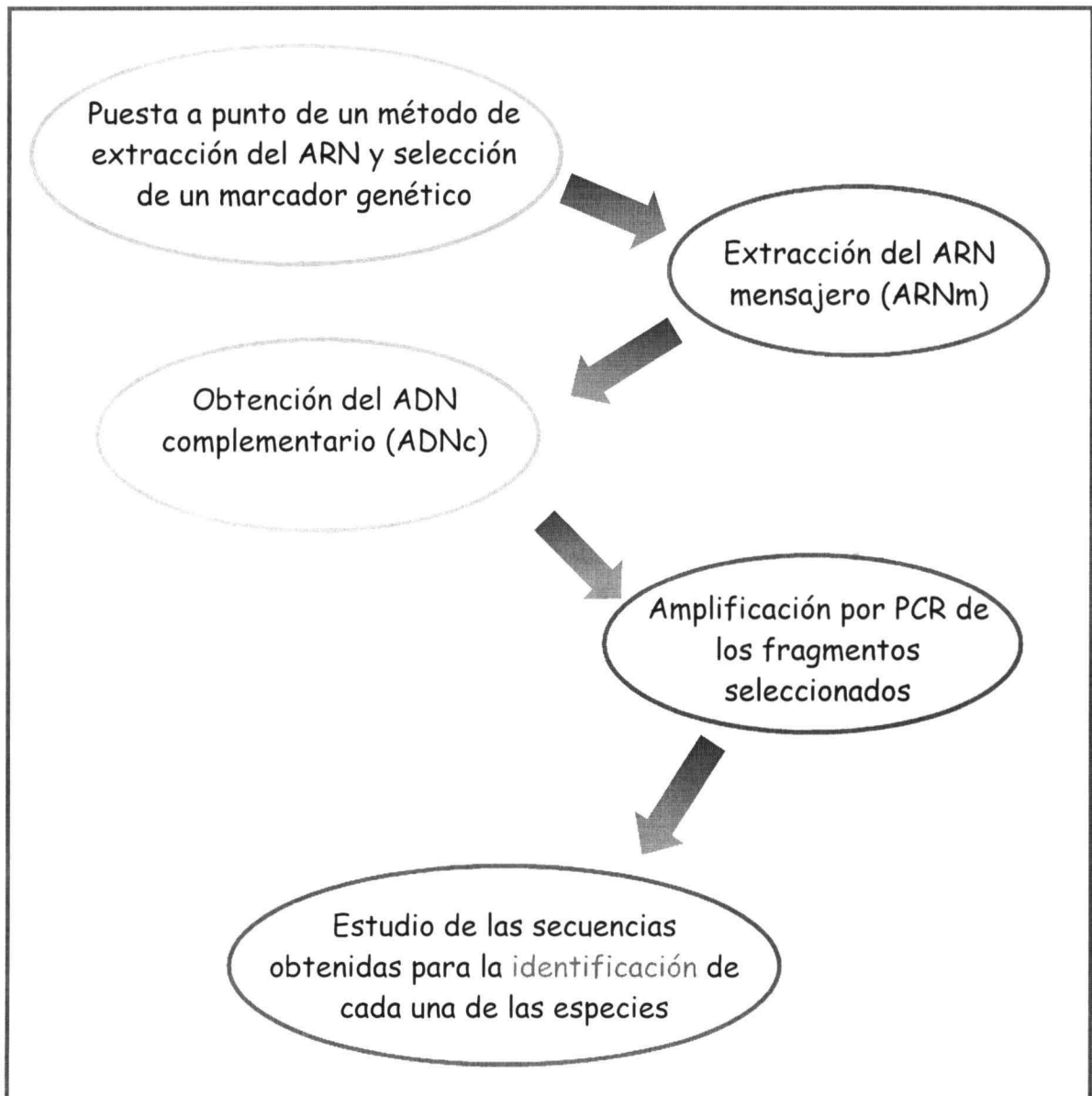


Figura 31. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación genética a partir de ARN de almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*), almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*).

A continuación, los tubos se incubaron 10 min a 4°C y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min, a 4°C. Al precipitar el ARN formó un sedimento blanco, el cual se lavó dos veces con etanol al 75%, centrifugando entre ambos lavados a 6.000 g durante 5 min (4°C). Finalmente, se secó el sedimento a temperatura ambiente (5-10 min), y se disolvió en 50-100 µL de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC-treated water).

III.2.3.2.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON RNeasy MINI KIT (QIAGEN)

Este protocolo se basa en la unión del ARN total a una membrana de gel de sílice que rellena unas pequeñas columnas "*RNA mini spin columns*", en las que la separación de fases se realiza por centrifugación, introduciendo las columnas en un tubo de centrífuga de 2 mL, "*tubo colector*".

Este método se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, 30 mg de tejido muscular del pie de las almejas se trocearon finamente con hojas de bisturí estériles y se colocaron en un tubo de centrífuga junto con 600 µL de tampón de lisis *RLT*, que contiene agentes desnaturalizantes como el isotiocianato de guanidina (GITC), que inactiva las enzimas ARNasas que degradan el ARN. Posteriormente, el homogeneizado se transfirió a una columna QIAshredder (QIAGEN), introducida en un tubo de 2 mL y se centrifugó durante 2 min a 12.000 g. El lisado eluido en el tubo de 2 mL se transfirió a un tubo limpio y se volvió a centrifugar durante 3 min a 12.000 g, utilizándose el sobrenadante en los siguientes pasos. A continuación, se añadió al sobrenadante un volumen igual de etanol al 70%, y se mezcló vigorosamente el contenido. Posteriormente, el contenido de los tubos se transfirió a la columna *RNA easy mini spin column*, y se centrifugó a 8.000 g durante 15 s. Se descartó, el contenido del *tubo colector* de 2 mL, se añadieron a la columna 700 µL de tampón de lavado *RW1* y se centrifugó a 8.000 g 15 s. Después, se sustituyó el *tubo colector* por uno limpio, se añadieron a la columna 500 µL de tampón *RPE* y se volvió a centrifugar a 8.000 g durante 15 s. Se volvieron a añadir 500 µL de tampón *RPE* a la columna y se centrifugó a 12.000g durante 2 min. Finalmente, para la elución del ARN, la columna *RNA easy mini spin column* se colocó en un tubo de 2mL limpio, se añadieron a la columna 30-50 µL de

agua tratada con DEPC y se centrifugó la columna a 9.000 g durante 1 min, recogiendo el ARN en el tubo colector.

III.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Una vez extraídos los ácidos nucleicos de las muestras de almejas mediante los protocolos descritos en el apartado anterior, se procedió a evaluar la calidad y concentración de los mismos. Para determinar la calidad se analizaron dos parámetros: integridad y pureza (Maniatis y col., 1982).

III.2.4.1. Integridad del ADN y ARN

Una medida directa de la calidad de los ácidos nucleicos es su grado de integridad. La presencia de ADN o ARN muy degradados indica que la muestra ha sido sometida a un procesamiento muy intenso, que se ha almacenado durante demasiado tiempo o en malas condiciones, o que el protocolo de extracción utilizado resulta excesivamente destructivo. En cualquier caso, cuanto mayor sea la fragmentación del ADN o ARN en una muestra, menor es el número de copias intactas de un gen que se encuentran presentes y, por tanto, resulta más difícil la amplificación del mismo por PCR.

La integridad del ADN o ARN extraído a partir de las muestras de almejas se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa (técnica descrita en el apartado III.2.7). Para ello, las muestras de ADN o ARN se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa D-1 (Hispanlab) al 1% en tampón TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) al que se incorporó 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. A continuación, las bandas correspondientes a los ADNs y ARNs de las muestras se compararon con un marcador de peso molecular (Gibco BRL). Cuanto mayor es la integridad del ADN extraído, la banda que se observa es de mayor tamaño y se encuentra más definida en el gel. Bandas de peso molecular pequeño y difuminadas en el gel indican un alto grado de degradación en el ADN (Maniatis y col., 1982). Sin embargo, en el caso del ARN se deben observar dos bandas definidas: una banda alta que corresponde al ARN ribosomal 28S (que suele tener el doble de concentración que la banda baja), y una banda baja que corresponde al ARN ribosomal 18S. No obstante, el ARN es mucho más sensible que el ADN a la

acción de enzimas que lo degradan, llamadas ARNasas, por lo que es fácil que aparezca degradado en mayor o menor medida.

III.2.4.2. Pureza del ADN y ARN

Al igual que el grado de integridad, la pureza de un ADN es un indicador de su calidad. Una alta concentración de proteínas, fenol o sales minerales en el ADN y ARN extraídos, puede dificultar en gran medida la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La pureza del ADN y ARN se comprobó mediante espectrofotometría de absorción. Para ello se realizaron lecturas de absorbancia de la muestra a 230 nm (λ de máxima absorción de sales minerales), 260 nm (λ de máxima absorción de ADN y ARN) y 280 nm (λ de máxima absorción de proteínas y fenol). Una muestra de ADN pura presenta una relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ comprendida entre 1,8-2,0. Sin embargo, una muestra de ARN pura diluida en agua presenta una relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ comprendida entre 1,5-1,9. Aunque, si el ARN se diluye en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ deberá estar comprendida entre 1,8-2,1. Si existe contaminación con proteínas o fenol, la relación será significativamente menor. Por otro lado, la relación $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ debe estar comprendida entre 0,3 y 0,7. Una relación mayor, indicaría la presencia de un alto contenido de sales en la muestra (Maniatis y col., 1982).

III.2.4.3. Concentración del ADN y ARN

La concentración del ADN en una muestra se puede valorar mediante electroforesis en gel de agarosa. Esto se consigue comparando la intensidad de la banda correspondiente a la muestra problema con bandas de patrones de concentración conocida. La comparación puede ser visual, obteniendo así resultados aproximados, o se pueden utilizar sistemas informáticos de análisis de imágenes que permiten obtener datos más precisos mediante la realización de curvas de calibrado (Maniatis y col., 1982). En este trabajo se utilizó el patrón de concentración de ADN Mass Ruler (Bio-Rad) y el sistema de análisis de imágenes Geldoc 1000 UV (Bio-Rad).

La medida de la absorbancia a 260 nm (λ de máxima absorción de ARN y ADN) de una dilución determinada de la muestra, también permite calcular la concentración del ADN y ARN en la misma. Una unidad de densidad óptica (1 D. O.) corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN bicatenario, 40 $\mu\text{g/mL}$ de ADN monocatenario o ARN y a 20 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótido monocatenario (Sambrook y col., 1989). Por lo tanto, si multiplicamos la lectura de absorbancia por el factor correspondiente y por la dilución empleada, obtendremos la concentración de ADN y ARN en la muestra.

III.2.5. OBTENCIÓN DEL ARN MENSAJERO (ARNm) Y ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

III.2.5.1. OBTENCIÓN DEL ARNm

Para la obtención del ARN mensajero (ARNm) a partir del ARN total extraído según los protocolos descritos en el apartado III.2.3.2., se utilizó el Kit comercial Oligotex™ Direct mRNA (Qiagen). En la mayoría de las células eucariotas (y algunos virus ARN), después de la transcripción de ADN a ARN en el núcleo celular, se añade al final del ARNm una cola de 20-250 nucleótidos de adenosina, llamada poly A⁺. Sin embargo, al ARN ribosómico (ARNr) y al ARN de transferencia (ARNt), que constituyen el 95% del ARN celular total, no se les añade dicha cola. En esta propiedad se basa el protocolo Oligotex™ Direct mRNA, ya que el Oligotex son partículas de latex-poliestireno cuya superficie está tapizada con oligonucleótidos dC₁₀T₃₀ unidos mediante enlaces covalentes. Por lo tanto, las partículas de Oligotex constituyen una suspensión estable, formando una superficie adecuada para la unión del ARNm.

Para el aislamiento del ARNm a partir del ARN total de las muestras de almejas, se empleó el protocolo *Oligotex mRNA Batch protocol*, indicado para la extracción del ARNm a partir del ARN total o bien a partir de muestras con contaminación de proteínas o ADN. Este método consistió en poner el ARN total (concentración menor que 0,25 mg) en un tubo de centrífuga de 1,5 mL y ajustar el volumen hasta 250 μL con agua tratada con DEPC. Posteriormente, se añadieron 250 μL de tampón *OB*B y 15 μL de *Oligotex Suspension Mix*, se mezcló bien el contenido del tubo y se incubó a 70°C durante 3 min. Este paso es necesario para

evitar estructuras secundarias del ARN. Después, se mantuvo la muestra a temperatura ambiente durante 10 min, para permitir la hibridación entre el oligo dT₃₀ de las partículas Oligotex y la cola de poly A⁺ del ARNm. A continuación, se centrifugó a 14.000 g durante 2 min, y se eliminó con cuidado el sobrenadante. El sedimento de Oligotex:ARNm se resuspendió con 1 mL de tampón de lavado OW2, se agitó bien la mezcla y se centrifugó a 14.000 g durante 2 min. Después, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se volvió a añadir 1 mL de tampón OW2, repitiendo así el paso anterior. Tras la centrifugación, se añadieron 20 µL de tampón de elución OEB (previamente calentado a 70°C), se mezcló bien el contenido y se centrifugó durante 2 min a 14.000 g. A continuación, se recogió el sobrenadante (que contenía el ARNm) y se transfirió a un tubo limpio. Finalmente, para conseguir un mayor rendimiento, se volvió a añadir 20 µL de tampón OEB (70°C) al tubo que contenía el Oligotex:ARNm, se volvió a centrifugar 2 min a 14.000 g, y se mezcló el sobrenadante con el obtenido anteriormente.

III.2.5.2. SÍNTESIS DEL ADNc

Después de la obtención del ARNm se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc). Esta síntesis la lleva a cabo una enzima ADN polimerasa-ARN dependiente, denominada transcriptasa inversa. Comercialmente se dispone de dos tipos de transcriptasa inversa: la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia de ratón (M-MLV RT); en este trabajo, se utilizaron ambas enzimas. Las transcriptasas inversas, como otras enzimas ADN polimerasas, requieren la presencia de un cebador para iniciar la síntesis de ADN. El cebador oligo-dT contiene varias timinas que se unen a la cola de poly A⁺ del ARNm (*Figura 32*).

Para la obtención del ADNc en las cuatro especies de almejas objeto de estudio, se empleó el cebador oligo-dT-adaptor, cuya secuencia se ha indicado en el apartado III.2.2.4.2. A continuación se explican detalladamente los protocolos de síntesis del ADNc con las dos enzimas transcriptasa inversa: aviar y de ratón.

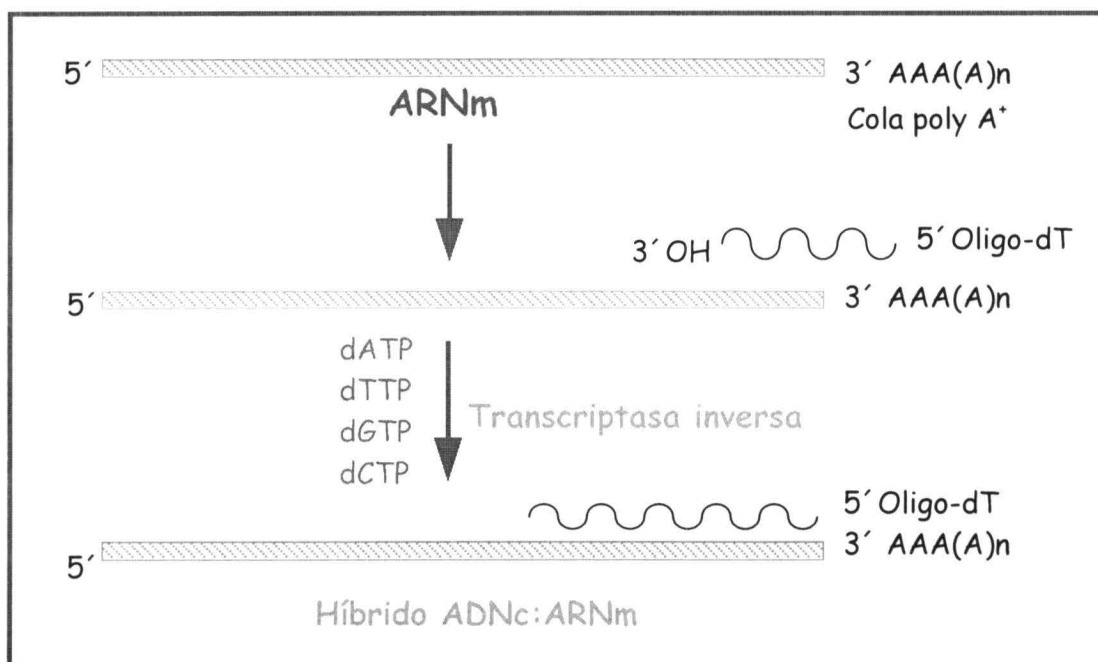


Figura 32. Síntesis de la primera cadena del ADNc empleando el cebador oligo-dT y la enzima transcriptasa inversa.

III.2.5.2.1. Síntesis del ADNc con transcriptasa inversa aviar (AMV-RT)

Para la obtención del ADNc a partir del ARNm obtenido en el apartado III.2.5.1., se empleó la transcriptasa aviar (AMV-RT) de Sigma. Esta transcriptasa inversa, se obtiene del virus de la mieloblastosis aviar y es capaz de producir ADNc de gran calidad a partir del ARNm que tenga estructuras secundarias complejas. Para la obtención del ADNc a partir del ARNm de la almeja babosa, fina, italiana y rubia, se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante.

Las reacciones se prepararon inicialmente en un volumen total de 16,5 µL con los siguientes componentes: dNTPs 500 µM, 100 ng del ARNm, 20 pmol de cebador oligo-dT-adaptor y agua tratada con DEPC. Se mezcló suavemente, mediante un pulso de centrifugación se recogieron los reactivos en el fondo del tubo, y se incubaron las reacciones a 80°C durante 10 min. Posteriormente, los tubos se mantuvieron en hielo y se añadieron los siguientes reactivos: tampón para AMV-RT, 1 U de transcriptasa inversa aviar y 0,5 U de inhibidor de enzimas ARNasas, dando lugar a un volumen total de 20 µL. Finalmente, para la obtención de la primera cadena del ADNc las reacciones se incubaron a 42°C durante 50 min. Todos los reactivos empleados se mantuvieron en hielo mientras tenía lugar la

preparación de las reacciones. El ADNc obtenido se distribuyó en alícuotas y se utilizó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta su uso.

III.2.5.2.2. Obtención del ADNc con transcriptasa inversa de ratón (M-MLV RT)

Para la síntesis del ADNc empleando la enzima transcriptasa inversa de la leucemia de ratón (M-MLV RT) de Epicentre, se partió del ARNm obtenido en la almeja babosa, fina, italiana y rubia (apartado III.2.5.1.), y se procedió según las instrucciones del fabricante. Para ello, se desnaturalizó el ARNm (100 ng por cada reacción) a 65°C durante 2 min y se colocó en hielo inmediatamente para evitar su renaturalización. Este paso tiene la misión de evitar estructuras secundarias del ARNm. Posteriormente, se preparó una mezcla que contenía los siguientes reactivos (todos ellos mantenidos en hielo): tampón M-MLV RT, ditioneitol (DTT) $0,05\text{ }\mu\text{M}$, dNTP $200\text{ }\mu\text{M}$, 20 pm del cebador oligo-dT-adaptor, 12,5 U de enzima M-MLV RT, 20 U de inhibidor de RNAsas y agua tratada con DEPC. Todos estos reactivos, se llevaron hasta un volumen final de $50\text{ }\mu\text{L}$, incluyendo el ARNm. Las reacciones se mezclaron cuidadosamente y se incubaron 1 h a 37°C . El ADNc obtenido se utilizó inmediatamente o se guardó a -20°C hasta su utilización.

III.2.6. AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS SELECCIONADOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los fragmentos génicos seleccionados como marcadores para la identificación de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*) se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). La PCR se realizó a partir del ADN extraído de las muestras (apartado III.2.3.1.), utilizando los cebadores descritos en los apartados III.2.2.1 al III.2.2.3. La PCR a partir de ADNc obtenido según los protocolos descritos en el apartado III.2.3.2 y sección III.2.5., se realizó utilizando los cebadores descritos en el apartado III.2.2.4.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en tubos de polipropileno estériles de pared fina y capacidad para 0,6 mL. Los componentes de cada reacción fueron los siguientes:

- Tampón de PCR [Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM; BSA 0,001%] suministrado por el fabricante a una concentración 10 veces superior a la de uso.
- Cl₂Mg.
- Cebadores.
- dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 200 μM.
- 2 U de ADN polimerasa Biotools (procedente de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* expresada en *E. coli*), en un tampón que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; Triton X-100 0,1% y glicerol 50% (v/v).
- ADN o ADNc.
- Agua para síntesis de ADN y secuenciación proteica de Genaxis (Biotechnology) (c.s.p. 50 μL).

Las concentraciones óptimas del ADN, cebadores y cloruro magnésico se determinaron para cada gen y juego de cebadores utilizado. Para evitar contaminaciones, la preparación de las reacciones se llevó a cabo en una campana de flujo laminar equipada con lámpara ultravioleta. En todos los ensayos se verificó la ausencia de contaminación mediante una reacción de control negativo.

Una vez incorporados al tubo todos los componentes de la reacción, éste se agitó manualmente para conseguir una mezcla homogénea. Mediante un pulso de centrifugación se llevaron los reactivos al fondo del tubo eppendorf. A continuación, se introdujeron los tubos en un termociclador.

La determinación de la temperatura y tiempo óptimos de los ciclos de amplificación programados en el termociclador para cada fragmento génico, se consiguió mediante ensayos sucesivos. No fue necesaria la adición de aceite mineral puesto que el termociclador utilizado (mod. "Progene", Techne) posee tapa calefactora que evita la evaporación.

Una vez finalizados los ciclos de temperatura programados, los productos de PCR obtenidos se conservaron a 4°C. Tras comprobar el resultado de la amplificación mediante electroforesis, los tubos se almacenaron a -20°C para análisis posteriores.

A continuación se muestran las condiciones empleadas en la reacción de PCR para cada pareja de cebadores.

III.2.6.1. GEN NUCLEAR α -ACTINA

III.2.6.1.1. Cebadores act-2 y act-4

Con los cebadores act-2 y act-4 se amplificó un fragmento de 521 pb del gen nuclear que codifica la proteína α -actina, a partir de muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 2.000-3.000 ng de ADN, 100 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, los tubos se sometieron a los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

93°C	3 min	}	x 1 ciclo
93°C	1 min		
55°C	1,5 min	}	x 35 ciclos
72°C	2 min		
72°C	5 min		
		}	x 1 ciclo

III.2.6.1.2. Cebadores act-5 y act-6

La utilización de los cebadores act-5 y act-6 permitió amplificar un fragmento de 150 pb del gen α -actina a partir de ADN de almeja babosa, fina, italiana y rubia.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 1000 ng de ADN, 50 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Los ciclos térmicos y de tiempo empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes:

93°C	3 min	} x 35 ciclos
93°C	45 s	
57°C	45 s	
72°C	45 s	

III.2.6.2. ESPACIADOR INTERNO DE LA TRANSCRIPCIÓN (ITS)

Con la pareja de cebadores ITS-1 e ITS-2, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.100 pb en las almejas babosa, fina e italiana, y dos fragmentos de 1.000 pb y 1.200 pb en la almeja rubia cuya longitud exacta se verificó tras la secuenciación.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 10-100 ng de ADN, 20 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Los ciclos de tiempo y temperatura empleados fueron los siguientes:

94°C	2 min	} x 35 ciclos
94°C	20 s	
55°C	20 s	
72°C	45 s	
72°C	2 min	} x 1 ciclo

III.2.6.3. GEN MITOCONDRIAL 16S ARNr

La pareja de cebadores 16SAR y 16SBR se utilizó para amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb del gen mitocondrial 16S ARNr de las almejas babosa, fina, italiana y rubia.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 100 ng de ADN, 100 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

En este caso, los ciclos térmicos y de tiempo empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes:

94°C	3 min	}	x 1 ciclo
94°C	20 s		
50°C	20 s	}	x 30 ciclos
72°C	45 s		
72°C	5 min		
		}	x 1 ciclo

III.2.6.4. GEN ARGININA QUINASA

III.2.6.4.1. Cebadores AKrna y AKom

Utilizando los cebadores AKrna y AKom, se amplificó un fragmento de 300 pb a partir del ADN complementario obtenido de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 2-4 μ L del ADNc, 20 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Los ciclos de tiempo y temperatura empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron:

94°C	3 min	}	x 1 ciclo
94°C	1 min		
45°C	1 min	}	x 35 ciclos
72°C	2 min		
		}	

III.2.6.4.2. Cebadores AKalm y oligo-dT-adaptor

Se emplearon los cebadores AKalm y oligo-dT-adaptor para amplificar un fragmento de 700 pb a partir del ADNc del gen que codifica a la enzima arginina quinasa de las almejas.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μL con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μM , 2 U de ADN polimerasa, MgCl_2 2 mM, 1-4 μL del ADNc, 20 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Los ciclos de tiempo y temperatura empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron:

94°C	3 min	}	x 1 ciclo
94°C	1 min		
50°C	1 min	}	x 35 ciclos
72°C	2 min		

III.2.7. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez amplificados por PCR los fragmentos génicos seleccionados, éstos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para visualizar y estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. Las moléculas de ADN, cargadas negativamente al pH del análisis, migran a través del gel hacia el ánodo cuando se aplica una corriente eléctrica. Esta migración es inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases, de modo que las moléculas con un peso molecular mayor migran más lentamente que las de peso molecular inferior (Slater y col., 1996).

Tampones, geles y soluciones empleadas

▪ Gel

Se compone de agarosa D-1 (Hispanlab) al 1,5% disuelta en tampón TAE, y bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. El bromuro de etidio permite visualizar el ADN bajo luz ultravioleta.

▪ Tampón Tris Acetato (TAE)

Tris Base	240	g
Ácido acético glacial	57,1	mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	100	mL

Agua bidestilada c.s.p. 1000 mL

▪ Solución de carga (GLS, Gel loading solution)

Azul de bromofenol 0,05% (p/v)

Glicerol 60% (p/v)

Agua bidestilada resto

▪ Patrón Mass Ruler (Bio-Rad)

Este patrón consiste en cinco fragmentos de ADN de peso molecular y concentración conocidos: 2,5 μ L del patrón contienen 10 ng de la banda de 100 pb, 20 ng de la de 200 pb, 50 ng de la de 500 pb, 70 ng de la de 700 pb y 100 ng de la banda de 1.000 pb.

▪ Patrón 1Kb Plus DNA LadderTM (Gibco BRL)

Contiene 20 fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 1.000 pb y 12 Kb: doce bandas entre 1.000 pb y 12.000 pb en incrementos de 1.000 pb, y ocho bandas en el intervalo de 100 pb a 1.000 pb, cuyos tamaños (expresados en pb) son de 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850 y 1000.

Preparación del gel

La agarosa se disolvió en tampón TAE en un matraz Erlenmeyer, calentando la mezcla hasta ebullición en un horno microondas. A continuación, la solución se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50°C y se añadieron 1 μ g/mL de bromuro de etidio. Finalmente, el gel se vertió en la cubeta de electroforesis y se introdujo el peine formador de pocillos.

Una vez polimerizado el gel, se retiró el peine y se añadió un volumen de tampón de electroforesis TAE suficiente para cubrirlo totalmente, quedando así listo para cargar las muestras en los pocillos.

Preparación de las muestras

Los productos de PCR (10 μ L) se mezclaron con 2 μ L de GLS y se depositaron en los pocillos del gel. En todos los ensayos se depositó en uno de los pocillos un patrón de tamaño molecular de ADN conocido.

Condiciones de separación

Las electroforesis se realizaron manteniendo el voltaje constante (100 V) durante un tiempo de aproximadamente 40 minutos. Finalizada la electroforesis, las bandas de ADN se visualizaron en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta. La imagen obtenida se registró mediante un sistema de documentación de geles GelDoc System 1.000 PC (BioRad) (*Figura 33*).

III.2.8. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS POR PCR

III.2.8.1. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para llevar a cabo la secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR conviene eliminar previamente los restos de aquellos reactivos no utilizados en la reacción de amplificación, fundamentalmente los cebadores, ya que éstos pueden interferir en la reacción de secuenciación. En este trabajo, la purificación de los productos de PCR se realizó a partir de las correspondientes bandas electroforéticas obtenidas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, con el fin de evitar la desnaturalización del ADN al fundir el gel.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente: 120 μ L de producto de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa LM-2 (Hispanlab) al 1%, con 1 μ g/mL de bromuro de etidio, a 100 V durante 90 min. La banda de ADN se cortó bajo luz UV, con una cuchilla estéril y se purificó utilizando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Para ello se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante (*Figura 34*):

- La banda de ADN se incubó con 3 volúmenes del tampón QG (suministrado con el kit de extracción) durante 10 min a 50°C. Una vez disuelta la banda en el tampón, la mezcla adquirió color amarillo, indicador de que el pH era $\leq 7,5$, es decir, adecuado para la adsorción del ADN a la matriz de la columna.
- Se añadió al gel disuelto un volumen igual de isopropanol y se agitó para conseguir una mezcla homogénea.

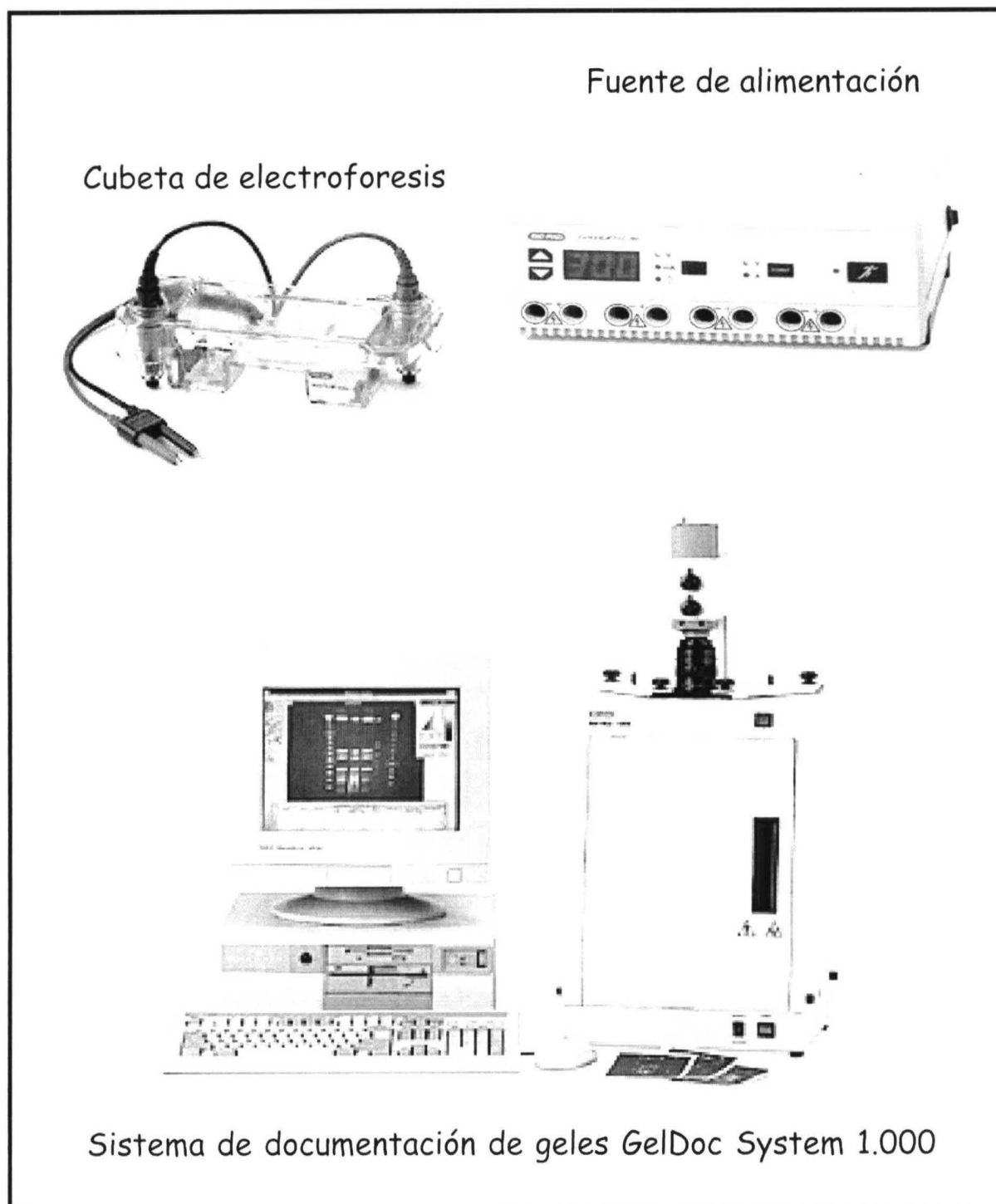


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de los fragmentos de ADN.

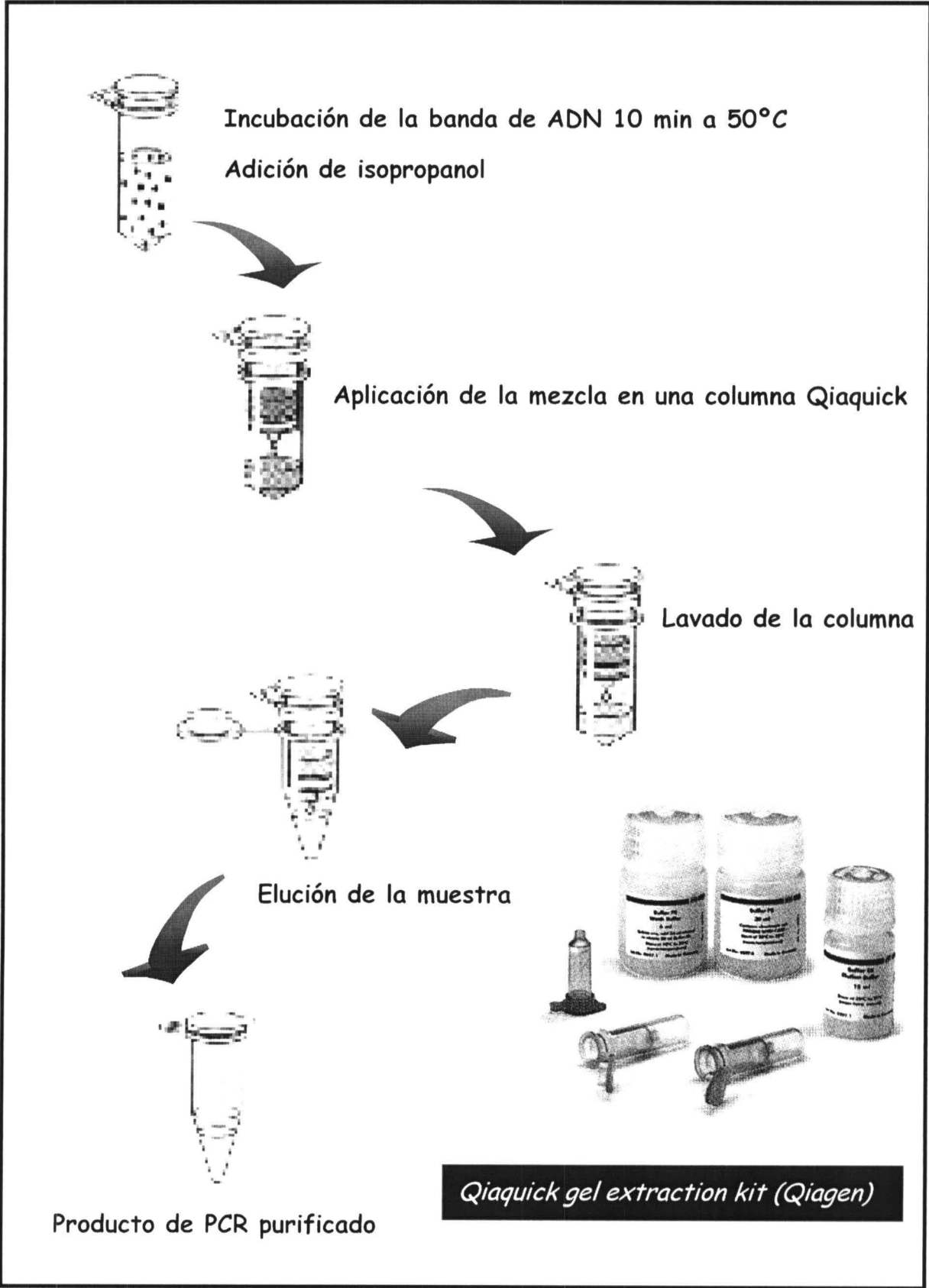


Figura 34. Purificación de productos de PCR utilizando el kit de purificación *Qiaquick gel extraction* (Qiagen).

- A continuación, la mezcla se aplicó en una columna *QIAquick* introducida en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 1 min a 10.000 g.
- Una vez descartado el líquido de elución, se añadieron a la columna 0,5 mL de tampón QG y se centrifugó de nuevo durante 1 min a 10.000 g.
- Posteriormente, la columna de purificación se lavó añadiendo 0,75 mL del tampón PE (suministrado con el kit de extracción) y se centrifugó durante 1 min a 10.000 g.
- Finalmente, la columna se introdujo en un tubo limpio y el ADN se eluyó de la matriz con 25 μ L de agua milliQ estéril, mediante centrifugación a 10.000 g durante 1 min.

Todos los tampones empleados fueron suministrados por el fabricante del kit. La purificación de los fragmentos amplificados de los genes α -actina, ITS, 16S ARNr y arginina quinasa se llevó a cabo por este método.

III.2.8.2. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR amplificados con los cebadores ITS-1 e ITS-2, y los amplificados con los oligonucleótidos AKalm y oligo-dT-adaptor, se clonaron en un vector como paso previo a su secuenciación. Para ello, se empleó el kit comercial pGEM[®]-T Easy Vector System II (Promega).

Este kit contiene el vector de clonación plasmídico denominado pGEM[®]-T Easy abierto con la enzima de restricción *Eco* RV y en ambos extremos 3' del punto de corte se han añadido residuos de timidina (T). Entre ambos extremos 3'-T se inserta el fragmento de ADN a clonar. Además, la adición de timinas mejora la eficiencia de ligación del producto de PCR, ya que previene la recircularización del vector (*Figura 35*). La región del vector que contiene múltiples sitios de clonación (MSC), se encuentra dentro de la región que codifica el α -péptido de la enzima β -galactosidasa y está flanqueada por los promotores de ARN polimerasa T7 y SP6. Cuando se insertan en el vector fragmentos de ADN, se inactiva la región codificadora del α -péptido, lo que permite identificar los clones recombinantes mediante un indicador de color de las colonias bacterianas que se desarrollan en las placas.

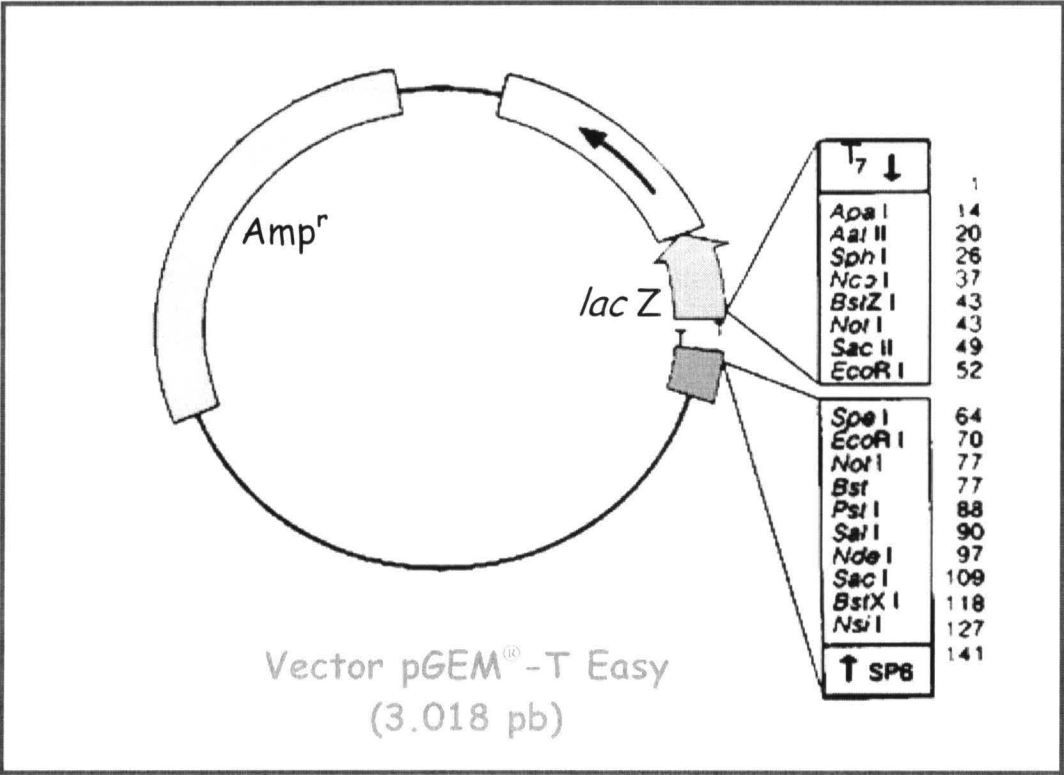


Figura 35. Estructura del vector circular pGEM[®]-T Easy. Se indican los sitios de iniciación de la transcripción de las RNA polimerasa T7 y SP6, la localización del gen *lac Z* y *Amp^r* (resistencia a la ampicilina), y los extremos 3' terminal con residuos de timidina.

Una vez que ha tenido lugar la ligación, el vector se introduce en células competentes de *E. coli* JM109, suministradas con el kit. Estas células competentes, una vez transformadas se siembran en placas de petri que contienen medio LB con ampicilina (antibiótico cuya resistencia está codificada en el vector), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa (X-gal), e isopropil- β -D-tiogalactopirano (IPTG). El X-gal es un compuesto cromógeno que es degradado enzimáticamente por la enzima β -galactosidasa activa, originando colonias de color azul. El IPTG es un inductor del promotor del gen *lac Z*. Por lo tanto, las colonias que han recibido un vector que contiene un inserto son incapaces de hidrolizar el X-gal, por lo que son de color blanco. Pero en las que no tienen el inserto, la enzima β -galactosidasa permanece activa e hidrolizan el X-gal, dando lugar a colonias azules.

III.2.8.2.1. LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Antes de realizar la ligación de los productos de PCR purificados (inserto) en el vector pGEM[®]-T Easy, es preciso conocer su concentración. Para hallar la

concentración del producto de PCR que había que incluir en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{Tamaño del inserto (Kb)}}{\text{Tamaño del vector (Kb)}} \times \text{Radio molar inserto/vector} = \text{ng de inserto}$$

teniendo en cuenta que el tamaño del vector es de 3,0 Kb, que se emplean 50 ng de vector y que la relación molar inserto/vector debe ser de 3/1.

Según esta ecuación, para la reacción de ligación de los fragmentos amplificados con los cebadores ITS-1 e ITS-2, de aproximadamente 1.100 pb, se necesitaron 55 ng de producto de PCR. Sin embargo, en la reacción de ligación de los fragmentos de 700 pb amplificados con los oligonucleótidos oligo-dT adaptor y AKalm se necesitaron 35 ng de producto de PCR.

En todas las reacciones de ligación se realizaron controles positivos (con un inserto de 542 bp suministrado por el fabricante) y controles negativos (sin inserto). Para realizar la reacción de ligación, los reactivos se mezclaron siguiendo los cálculos de la siguiente tabla:

REACTIVOS	Producto de PCR (inserto)	Control negativo	Control positivo
Tampón de ligación 2×	5 µL	5 µL	5 µL
Vector pGEM®-T Easy (50 ng/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR	X µL	-	-
Control con inserto (4ng/µL)	-	2 µL	-
Enzima ADN ligasa T4 (5 U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Agua bidestilada estéril (c.s.p.)	10 µL	10 µL	10 µL

La X indica los µL de producto de PCR requeridos para la ligación. La concentración que tenía cada fragmento de producto de PCR, se calculó utilizando el patrón de concentración de ADN Mass Ruler y el sistema de análisis de imágenes Geldoc 1000 UV, como se indica en la sección II.2.4.3. Una vez

mezclados los reactivos de la reacción de ligación, los tubos se incubaron a 4°C durante toda la noche.

III.2.8.2.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

Una vez terminada la reacción de ligación, se procedió a la transformación de células competentes de *E. coli* JM109 con el vector pGEM®-T Easy. Para ello se utilizaron los siguientes medios de cultivo y soluciones.

Medios de cultivo y soluciones empleadas

▪ Medio LB

Bacto® -Tryptona	10	g
Bacto® -Extracto de levadura	5	g
NaCl	5	g
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL

El pH del medio se ajustó a 7,0 con NaOH 4 M.

▪ Medio LB con ampicilina

Se añadieron 15 g de agar a un litro de medio LB. Después el medio de cultivo se esterilizó en autoclave, se dejó enfriar, y cuando estaba a unos 50°C se añadió la ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. Se vertieron 30-35 mL de medio en cada placa de petri de 85 mm de diámetro y se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4°C hasta su uso.

▪ Medio LB con ampicilina/IPTG/X-gal

A la superficie de las placas de medio LB/ampicilina se añadieron 100 µL de IPTG (100 mM) y 20 µL de X-gal (50 mg/mL), se extendieron estos suplementos con una asa de Driglasky y se permitió su adsorción a la placa durante 30 min a 37°C.

▪ Medio SOC

Bacto® -Tryptona	2	g
Bacto® -Extracto de levadura	0,5	g
NaCl 1M	1	mL

KCl 1M	0,25	mL
Mg ²⁺ 2 M	1	mL
Glucosa 2 M	1	mL

Se mezclaron todos los componentes del medio, salvo el Mg²⁺ y la glucosa con 97 mL de agua bidestilada estéril y se esterilizó en autoclave. Cuando el medio se enfrió a temperatura ambiente se añadieron el Mg²⁺ y la glucosa a una concentración final de 20 mM. Posteriormente, se enrasó hasta 100 mL, se filtró el medio a través de filtros de 0,2 µm y se ajustó el pH a 7,0.

Transformación de células competentes

Para la transformación, se prepararon 10 placas de medio LB/ampicilina/IPTG/X-gal por cada reacción de ligación y se procedió según las instrucciones del fabricante:

- Se dió un pulso de centrifuga a los tubos que contenían las reacciones de ligación. De cada reacción de ligación se tomaron 2 µL, que se introdujeron en tubos de centrifuga de 1,5 mL.
- Se descongelaron en hielo las células competentes de *E. coli* JM109 (mantenidas a -85°C), y se mezclaron suavemente.
- Lentamente, se transfirieron 50 µL de células a cada uno de los tubos que contenían reacción de ligación, se mezcló lentamente el contenido de los tubos, y se mantuvieron en hielo durante 20 min.
- Posteriormente, los tubos se calentaron a 42°C durante 45-50 s, e inmediatamente se situaron en hielo durante 2 min.
- Tras la incubación en hielo, se añadieron a cada tubo 950 µL de medio SOC a temperatura ambiente.
- Los tubos se incubaron durante 1,5 h a 37°C en agitación a 1.500 r.p.m.
- Finalmente, cuando las células competentes habían crecido en el medio SOC, se sembraron en placas de LB/ampicilina/IPTG/X-gal y por duplicado 100 µL, 50 µL y 20 µL de cada tubo. Además, se sembraron 2 placas con 100 µL de control positivo y 2 placas con 100 µL de control negativo. Las placas se incubaron a

37°C durante 16 h, y se mantuvieron 2 h a 4°C para mejorar la diferenciación entre las colonias azules (control negativo) y las blancas (clones transformados).

Tras la transformación, se contaron las colonias blancas y azules desarrolladas en las placas, con el fin de analizar la eficiencia de transformación, y se sembró media colonia de cada placa en un tubo se microcentrífuga con 1 mL de medio líquido LB/ampicilina. Tras un período de incubación de 12 h en agitación a 37 °C, los tubos se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las colonias transformadas

Cuando las células transformadas crecieron en el medio líquido LB/ampicilina, se emplearon para la amplificación de los fragmentos clonados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realizó utilizando los cebadores del vector, M13F y M13R, que hibridan a una distancia de 105 pb del punto de inserción del fragmento de ADN. De este modo, analizando el tamaño de los productos de PCR resultantes, se identificaron los clones que habían insertado el producto de PCR a secuenciar. Para ello, se amplificaron por PCR 10 colonias por cada fragmento de PCR clonado.

La secuencia de los cebadores empleados es:

M13F: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'

(17 nucleótidos, $T_m = 62,3^\circ\text{C}$)

M13R: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

(17 nucleótidos, $60,3^\circ\text{C}$)

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μL con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μM , 2 U de ADN polimerasa, MgCl_2 2 mM, 2-10 μL de medio líquido (en el que había crecido cada clon), 20 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Los ciclos térmicos y de tiempo empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes:

94°C 5 min } x 1 ciclo

92°C	2 min	} x 30 ciclos
60°C	2 min	
72°C	2 min	

Una vez realizada la electroforesis según el apartado III.2.7. y tras verificar los productos de PCR que tenían un tamaño adecuado (pb correspondientes al producto de PCR insertado más pb correspondientes al vector), dos clones correspondientes a cada fragmento de PCR se purificaron según el apartado III.2.8.1. y se secuenciaron empleando los oligonucleótidos del vector (M13F y M13R).

III.2.8.3. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS

La secuenciación de los productos de PCR amplificados con las parejas de cebadores act-2/act-4, ITS-1/ITS-2 y AKom/AKrna la llevó a cabo el personal del Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid). Sin embargo, los productos de PCR amplificados con los cebadores AKalm/oligo-dT-adaptor y 16SAR/16SBR se secuenciaron en el Centro de Secuenciación de ADN de la Universidad Complutense de Madrid. En ambos centros, la secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM modelo 377 (Perkin/Elmer) con el kit de secuenciación *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (Perkin/Elmer).

Los cebadores utilizados para la secuenciación de los diversos fragmentos fueron los siguientes:

- act-2/act-4 para el gen nuclear α -actina.
- 16SAR/16SBR para el gen 16S ARNr.
- AKom/AKrna para el fragmento de 300 pb del gen que codifica la enzima arginina quinasa.
- M13F y M13R para los productos de PCR amplificados con los juegos de cebadores AKalm/oligo-dT-adaptor e ITS-1/ITS-2, y clonados en el vector pGEM[®]-T Easy.

- No obstante, para secuenciar completamente el fragmento generado con los cebadores ITS-1 e ITS-2, fue necesario diseñar cebadores internos. Los oligonucleótidos ITS-4 e ITS-3 (cuya secuencia es inversa y complementaria a la secuencia del cebador ITS-4), se diseñaron basándose en las regiones conservadas de las secuencias parciales de los productos de PCR amplificados previamente con los cebadores ITS-1 e ITS-2. Sus secuencias son:

ITS-3: 5'-GAC CCT CGG ACA GGC GTG GC-3' (20 nucleótidos, T_m= 73,3°C)

ITS-4: 5'-GCC ACG CCT GTC CGA GGG TC-3' (20 nucleótidos, T_m 73,3°C)

El kit de secuenciación *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (Perkin/Elmer) consta de: tampón de reacción, MgCl₂, desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), enzima ADN polimerasa y didesoxiterminadores (ddATP*, ddTTP*, ddGTP* y ddCTP*), marcados cada uno de ellos con una diclororrodamina diferente (dR6G, dROX, dR110 y dTAMRA respectivamente). Las cuatro diclororrodaminas presentan, entre ellas, distinta longitud de onda de máxima absorción, lo que permite incluirlas en la misma reacción de secuenciación. A esta premezcla se añade el ADN (unos 50 ng) y el cebador (5 pmol). La temperatura de hibridación del cebador con el ADN diana (T_a) utilizada en la reacción de secuenciación, ha de ser 5°C inferior a la T_a del cebador. La temperatura de elongación es de 60°C. Los productos de la reacción se analizaron en geles de poliacrilamida y se cuantificaron mediante fluorimetría. Cada base de la secuencia se corresponde con un pico del registro y a su vez con una banda de color.

III.2.9. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE ADN

Para analizar las secuencias de los productos de PCR se utilizaron los siguientes programas y herramientas, incluidos en el paquete informático *Genetic Computer Group* (GCG), versión 9.0 (Universidad de Wisconsin, EE.UU.):

- **STRINGSEARCH** para buscar secuencias correspondientes a los genes α -actina, ITS, arginina kinasa y 16S ARNr en las bases de datos *GenBank* y *EMBL*.
- **SEQED** para editar secuencias.

- **GAP** para localizar los cebadores a lo largo del producto de PCR amplificado y para comparar parejas de secuencias similares. Esta herramienta permite alinear dos secuencias, minimizando el número de huecos y maximizando el número de acoplamientos.
- **PILEUP** para alinear múltiples secuencias correspondientes al mismo gen en diversos individuos de la misma especie o de especies diferentes.
- **LINEUP** para alinear manualmente las secuencias correspondientes al mismo gen en diversos individuos de la misma especie o de especies diferentes.
- **PRETTY** para obtener secuencias consenso a partir de secuencias alineadas previamente con el programa PILEUP.
- **MAP** para determinar los puntos de corte de enzimas de restricción en las secuencias de ADN y para traducir estas secuencias a aminoácidos. **MAPSORT** es una modificación de este programa que muestra el tamaño de los fragmentos esperados tras la digestión de una secuencia con una o varias enzimas de restricción.
- **TRANSLATE** para transformar una secuencia nucleotídica en secuencia aminoacídica.
- **PEPTIDE STRUCTURE** para estudiar la estructura secundaria de una secuencia de aminoácidos.

III.2.10. TÉCNICA DE PCR-RFLP

Los productos de PCR de los genes α -actina, 16S ARNr y del espaciador interno de la transcripción (ITS), se digirieron con diferentes endonucleasas con el fin de obtener perfiles de restricción específicos que permitiesen la identificación de cada una de las especies de almejas estudiadas (*Figura 36*).

La selección de las enzimas apropiadas para la digestión de cada fragmento, se realizó considerando los mapas de restricción obtenidos con el programa *MAP*, del paquete informático *GCG*.

Para el estudio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), no fue necesaria la purificación de los productos de PCR como paso previo a la digestión con endonucleasas.

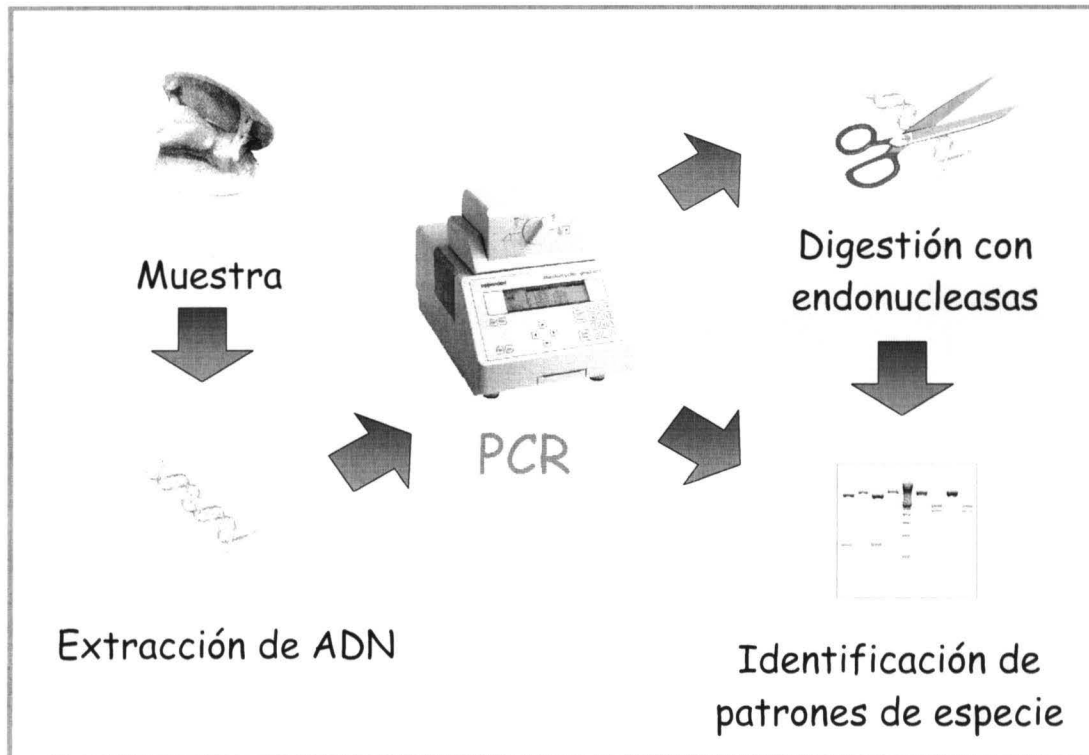


Figura 36. Esquema de las etapas de la técnica de PCR-RFLP.

Los fragmentos de ADN resultantes de la restricción enzimática, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa MS-8 (Hispanlab) al 3,5% en tampón TAE. La electroforesis se desarrolló a 100 voltios durante 1 hora. Los geles se analizaron mediante el sistema de documentación de geles Geldoc 1000 UV (Bio-Rad). El tamaño de los fragmentos de restricción se estimó por comparación con diversos marcadores de tamaño molecular.

A continuación se describen las condiciones de digestión empleadas para cada uno de los productos de PCR analizados mediante RFLP.

III.2.10.1. GEN NUCLEAR α -ACTINA

Los productos de PCR obtenidos a partir de ADN de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*) con los cebadores act-2 y act-4, se digirieron con las endonucleasas *Mae* III y *Rsa* I (Roche).

Las reacciones de digestión se prepararon para cada enzima por separado, en un volumen total de 20 μ L. Las digestiones con la enzima *Mae* III contenían 100-200 ng de ADN del producto de PCR sin purificar, 2 U de enzima, 10 μ L de tampón

de digestión 2x suministrado por el fabricante y agua bidestilada estéril (c.s.p. 20 µL). Las reacciones de digestión con la enzima *Rsa* I contenían 100-200 ng de ADN del producto de PCR sin purificar, 10 U de enzima, 2 µL de tampón de digestión 10x facilitado por el fabricante y agua bidestilada estéril (c.s.p. 20 µL).

Las reacciones de restricción con las enzimas *Mae* III y *Rsa* I se incubaron 16 horas a 55°C y 37°C, respectivamente.

III.2.10.2. ESPACIADOR INTERNO DE LA TRANSCRIPCIÓN (ITS)

Los productos de PCR amplificados con la pareja de cebadores ITS-1/ITS-2 a partir de ADN de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) se digirieron con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Rsa* I (Roche).

Las reacciones de digestión se realizaron por separado para cada una de las enzimas. Cada reacción contenía 100-200 ng de ADN del producto de PCR sin purificar, 10 U de enzima, 10 µL del tampón de digestión 2x facilitado por el fabricante y agua bidestilada estéril (c.s.p. 20 µL).

Las reacciones de restricción con las enzimas *Hinf* I y *Rsa* I se incubaron durante 16 horas a 37°C.

III.2.10.3. GEN MITOCONDRIAL 16S ARNr

Los fragmentos de ADN amplificados con los cebadores 16SAR y 16SBR a partir de las muestras almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*), se digirieron con las enzimas *Bsm* AI y *Bsr* I (New England Biolabs, Beverly, EE.UU.).

Las reacciones de digestión se prepararon, para cada enzima por separado, con los siguientes componentes: 100-200 ng de ADN del producto de PCR sin purificar, 5 U de enzima, 2 µL del tampón de digestión 10x facilitado por el fabricante y agua bidestilada estéril (c.s.p. 20 µL).

Las digestiones con las enzimas *Bsm* AI y *Bsr* I se incubaron durante 16 horas a 55°C y 65°C, respectivamente.

III.2.11. TÉCNICA DE PCR-SSCP

Los productos de PCR amplificados con la pareja de cebadores act-5/act-6 se analizaron mediante la técnica de PCR-SSCP con el fin de obtener perfiles específicos de ADN monocatenario, que permitieran la identificación de la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*).

Para ello, los productos de PCR se purificaron con el kit *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.8.1. A continuación, los productos de PCR purificados se desnaturalizaron en dos hebras de ADN monocatenario (ADNmc). Una vez desnaturalizadas, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un aparato Phastsystem™ (Pharmacia) (Figura 37).

III.2.11.1. DESNATURALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La concentración de ADN de los productos de PCR purificados se ajustó a 7 ng/μL con agua bidestilada estéril. A continuación, 1 μL de producto de PCR se mezcló con 3 μL de solución desnaturalizante (formamida 98%; azul de bromofenol 0,05%; xileno cianol 0,05%; glicerol 2%). La mezcla se calentó a 95°C durante 5 min para favorecer la desnaturalización del ADN. Inmediatamente después las muestras se colocaron en hielo y se cargaron en el gel de poliacrilamida.

III.2.11.2. ELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS

Los productos de PCR desnaturalizados se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando un aparato Phastsystem™ (Pharmacia). Este aparato permite controlar automáticamente las condiciones de voltaje, intensidad, tiempo y temperatura empleadas en la separación. El sistema automatizado Phastsystem™ consta de una unidad de separación y control, donde se realiza la electroforesis y de una unidad de revelado para la tinción y lavado de los geles.

La electroforesis de las muestras se llevó a cabo en la unidad de separación, utilizando los geles de poliacrilamida comerciales Phastgel® Homogeneous 12.5 (Pharmacia) y el tampón de electroforesis Phastgel® DNA Buffer strips (Pharmacia).

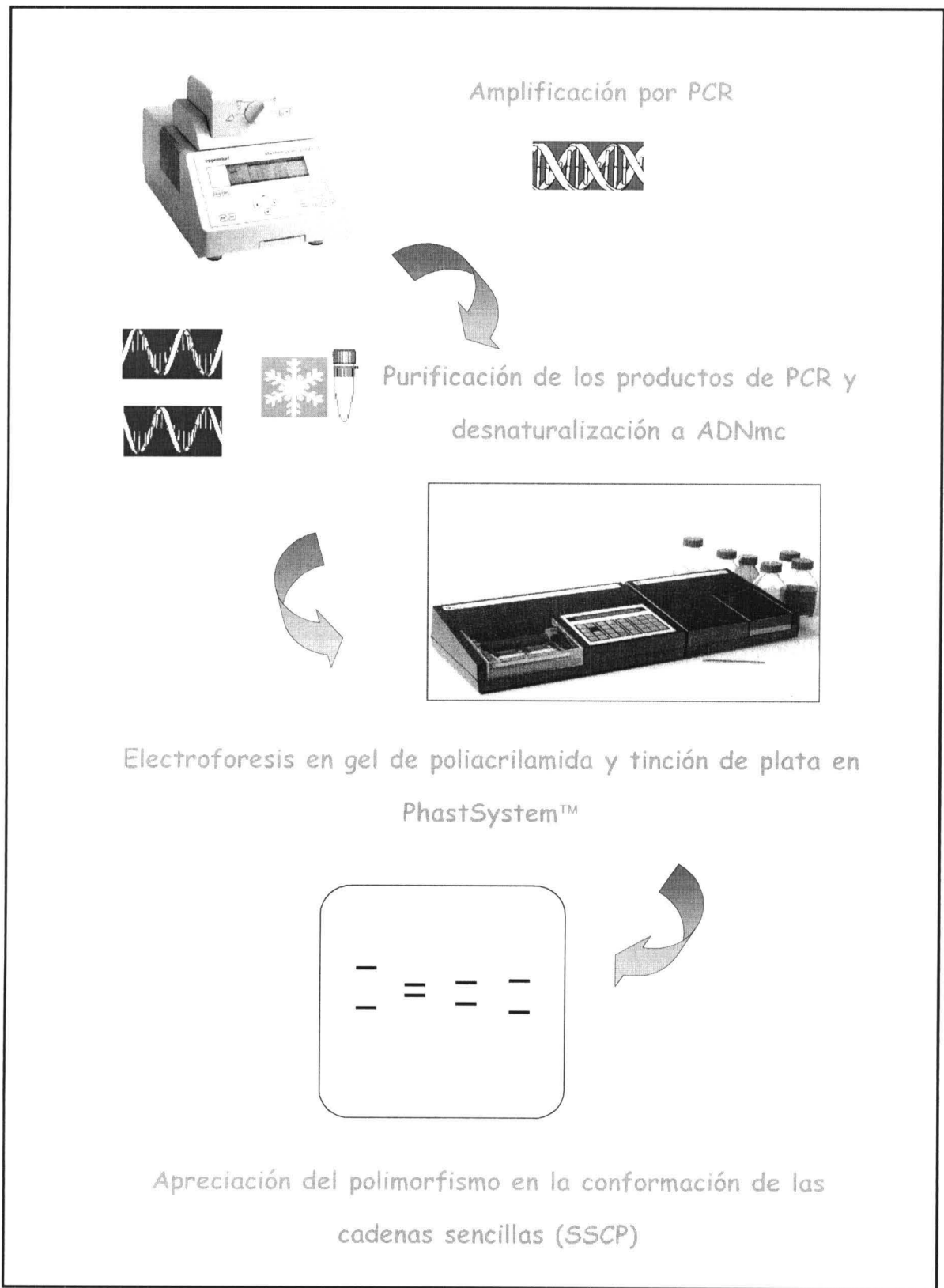


Figura 37. Esquema de los pasos a seguir utilizando el sistema automatizado Phastsystem™.

Condiciones de separación

La movilidad electroforética del ADN a lo largo del gel de poliacrilamida es proporcional al voltaje y al tiempo aplicado. Dada la gran variabilidad que experimenta el voltaje a lo largo del tiempo, el sistema Phastsystem™ se programa en voltios-hora (Vh). Este aparato dispone, para ello, de un integrador de voltios en el tiempo.

La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones:

- 1) Pre-carrera: 400 V, 10 mA, 2,5 W, 4°C, 100 Vh.
- 2) Aplicación de la muestra: 400 V, 1 mA, 2,5 W, 4°C, 2 Vh.
- 3) Carrera: 400 V, 10 mA, 2,5 W, 2°C, 100 Vh.

Tinción de los geles

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron con nitrato de plata. La tinción se llevó a cabo en la unidad de tinción del sistema Phastsystem™, utilizando el kit de tinción Phastgel® DNA Silver Staining Kit (Pharmacia) según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Las bandas de ADN obtenidas tras la tinción con plata, se analizaron visualmente.

III.3. MÉTODOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

En la *Figura 38* se muestra un esquema de la metodología desarrollada en este trabajo para la identificación de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*), mediante técnicas inmunoenzimáticas de ELISA. A continuación se describe detalladamente cada uno de los métodos empleados.

III.3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS

Los extractos antigénicos utilizados en este trabajo estaban constituidos por una mezcla de proteínas solubles, extraídas a partir de las especies de almeja: babosa (*Venerupis pullastra*), fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*) y rubia (*Venerupis rhomboides*).

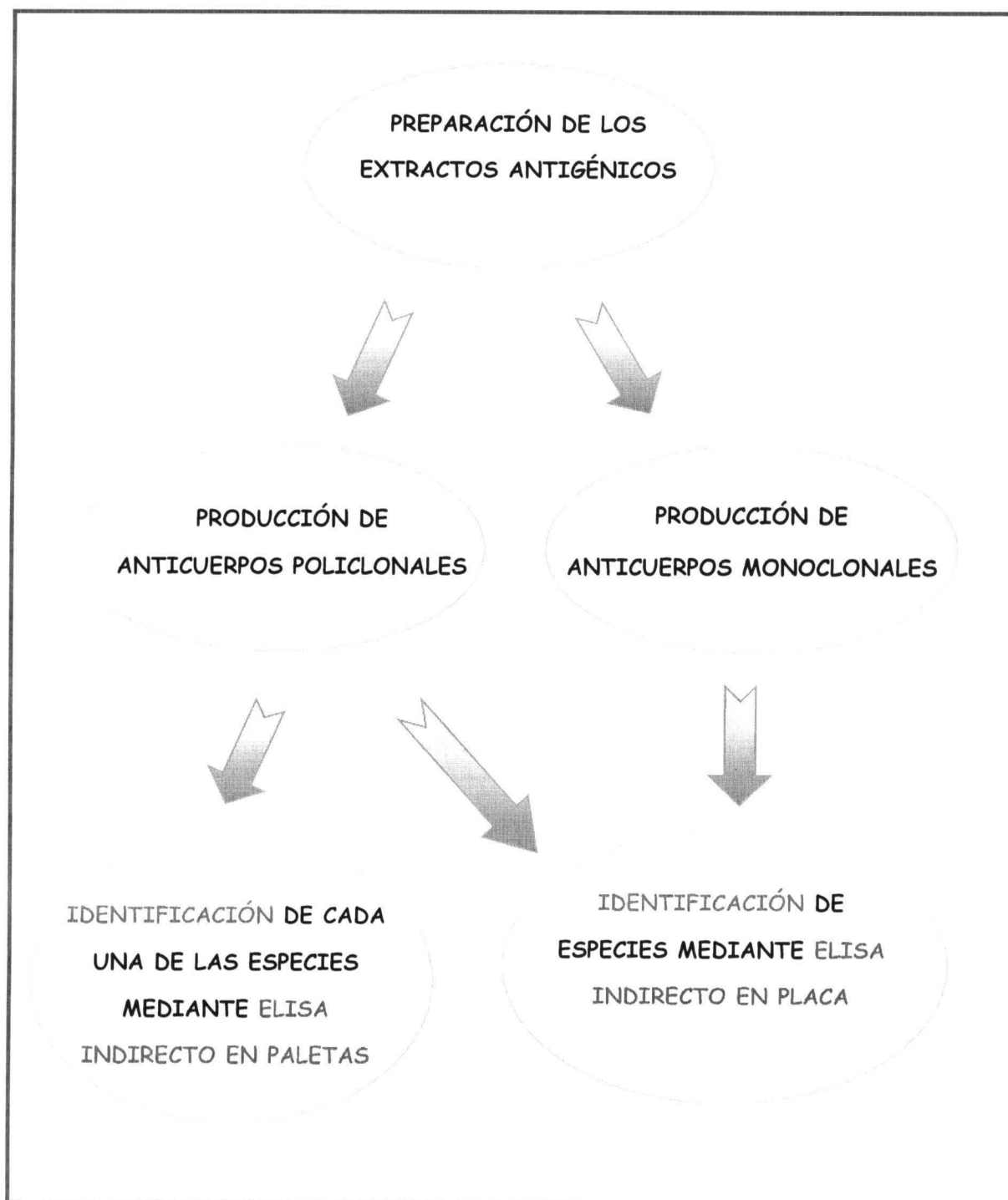


Figura 38. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja italiana (*Ruditapes philippinarum*) y almeja rubia (*Venerupis rhomboides*), mediante técnicas inmunológicas.

Una vez realizada la extracción de las proteínas solubles de cada una de las especies, se determinó el contenido proteico de los extractos antigénicos de almeja babosa, fina, italiana y rubia, utilizando el ensayo de determinación de proteína *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad).

III.3.1.1. EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES

La extracción de las proteínas solubles de almeja babosa, fina, italiana y rubia, se realizó mezclando, en primer lugar, las almejas sin su concha procedentes de 20 individuos distintos. A continuación, 200 g de esta mezcla se homogeneizaron en 1 L de solución salina (8,5 g/L de NaCl) y se mantuvieron en agitación durante 2 h a 20°C en un lugar oscuro para evitar la oxidación del homogeneizado. Transcurrido este tiempo, los homogeneizados se centrifugaron a 3.500 g durante 30 min a 10°C. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de filtros de vidrio borosilicatados (diámetro del poro 40-90 μm), empleando para ello un aspirador de vacío. A continuación, parte de los sobrenadantes obtenidos a partir de las cuatro especies de almejas se liofilizaron, y otra parte se mantuvieron sin liofilizar a -20°C. Los extractos proteicos liofilizados se almacenaron en envases herméticos en refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización (*Figura 39*).

El extracto antigénico liofilizado correspondiente a las proteínas solubles de almeja babosa se denominó *PSB*, el de las proteínas solubles de almeja fina *PSF*, el de las proteínas solubles de almeja italiana *PSI*, y *PSR* el de las proteínas solubles de almeja rubia. Los extractos antigénicos de almeja babosa, fina, italiana y rubia que se mantuvieron sin liofilizar, conservados en congelación, se denominaron *PSB2*, *PSF2*, *PSI2* y *PSR2*.

III.3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La determinación del contenido proteico de los extractos antigénicos de almeja babosa (*PSB*), fina (*PSF*), italiana (*PSI*) y rubia (*PSR*), se llevó a cabo utilizando el ensayo de determinación de proteína *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad).

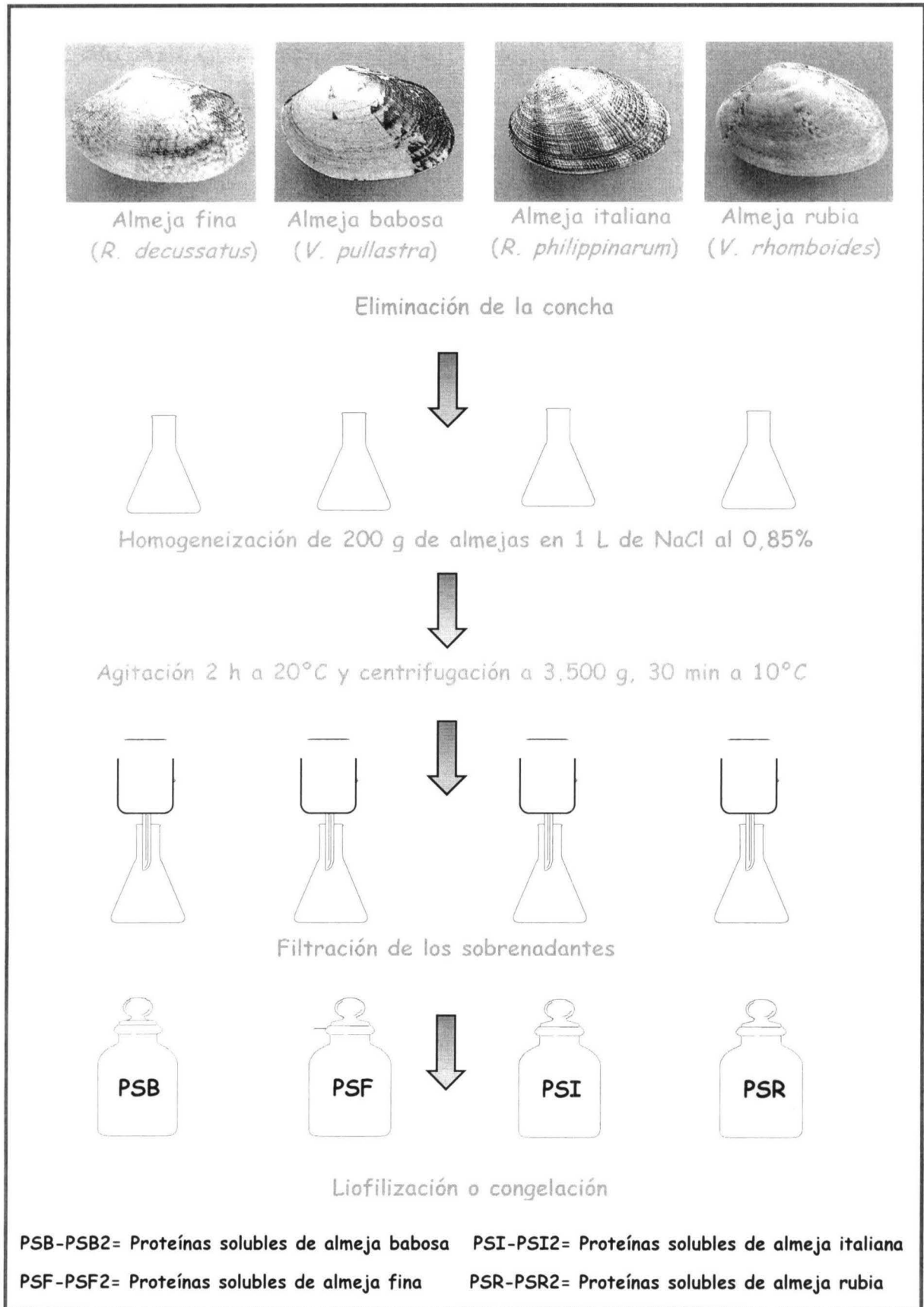


Figura 39. Preparación de los extractos antigénicos.

Este ensayo se basa en la observación de que la absorbancia máxima para una solución ácida del colorante *Azul de Coomassie G-250* cambia desde una λ de 465 nm hasta una λ de 595 nm, cuando tiene lugar la unión de éste a proteínas y la formación de complejos proteína-colorante. El procedimiento estándar permite medir entre 20-140 μg de proteína, mientras que con el microensayo se puede cuantificar entre 1-20 μg de proteína. En nuestro caso se llevó a cabo el ensayo estándar.

Reactivos

- Proteína patrón

Fracción V de la seroalbúmina bovina (BSA), facilitada por el fabricante.

- Reactivo coloreado

Solución ácida del colorante *Azul de Coomassie G-250*, suministrada por el fabricante.

Procedimiento

- Se preparó una batería de tubos que contenían desde 0,2 a 1,4 mg/mL de proteína patrón (BSA) en agua destilada. Se realizaron cuatro diluciones en agua de cada uno de los extractos antigénicos y se preparó un blanco con agua destilada.
- En tubos limpios y secos se colocaron 0,1 mL de cada una de las diluciones de proteína patrón, de las muestras y del blanco.
- A cada uno de los tubos se añadieron 5 mL del reactivo coloreado y se mezcló bien agitando en un agitator, o invirtiendo varias veces el tubo.
- Transcurridos 15 min se midió la absorbancia de las muestras a una λ de 595 nm.

La representación gráfica de la absorbancia de las distintas diluciones de proteína patrón frente a la concentración de proteína, permite obtener una curva de calibrado. La concentración de las muestras problema se puede calcular interpolando las medidas de absorbancia correspondientes en la recta de calibrado.

III.3.2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Los anticuerpos policlonales se encuentran en el suero de los animales de laboratorio sometidos a la exposición continuada a un antígeno. Constituyen una mezcla heterogénea de anticuerpos procedentes de muchos clones de linfocitos B, que reaccionan frente a distintos determinantes antigénicos. La afinidad y especificidad de estos anticuerpos varía según los lotes empleados en la inmunización, y por lo general es preciso purificar los inmunosueros antes de su utilización en los inmunoensayos. A continuación se describe detalladamente la pauta de inmunización de los conejos por inoculación de los extractos antigénicos de almeja babosa (PSB), fina (PSF), italiana (PSI) y rubia (PSR). Una vez realizada la sangría final, los inmunosueros obtenidos se purificaron parcialmente mediante precipitación con sulfato amónico al 50%. Finalmente, se procedió a la neutralización selectiva de los anticuerpos purificados utilizando la técnica de inmunoadsorción.

III.3.2.1. PAUTA DE INMUNIZACIÓN

Para la producción de inmunosueros se emplearon 4 lotes de 2 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 3-3,5 Kg de peso. Al primer lote se le inoculó el extracto antigénico de proteínas solubles de almeja babosa (PSB), al segundo, el extracto antigénico de proteínas solubles de almeja fina (PSF), al tercer lote, el extracto antigénico de proteínas solubles de almeja italiana (PSI), y al cuarto, el extracto antigénico de las proteínas solubles de almeja rubia (PSR).

La inmunización de cada lote comenzó con la inoculación intradérmica, en varios puntos de la espalda del animal, del extracto antigénico correspondiente (5 mg de proteína) emulsionado en 0,5 mL de Adyuvante Completo de Freund y 0,5 mL de solución salina estéril (NaCl al 0,85%). Las inoculaciones se prolongaron durante 4 meses a intervalos de 1-2 semanas, utilizando el Adyuvante Incompleto de Freund, en lugar del Completo, a partir de la segunda inoculación y alternando inoculación intradérmica e intramuscular (*Tabla 18*).

Antes de la primera inoculación de los extractos antigénicos se realizó una sangría inicial (S_0) para comprobar la ausencia de reactividad de los sueros de los animales frente a los antígenos estudiados.

Tabla 18. Pauta de inmunización de los conejos por inoculación de los extractos antigénicos de almeja babosa, fina, italiana y rubia.

EXTRACTOS ANTIGÉNICOS									
Días	PSB (mg)	PSF (mg)	PSI (mg)	PSR (mg)	SSE (mL)	ACF (mL)	AIF (mL)	Inoculación	Sangría
0	-	-	-	-	-	-	-	-	S ₀
13	5	5	5	5	0,5	0,5	-	ID	-
20	5	5	5	5	0,5	-	0,5	IM	S ₁
27	5	5	5	5	0,5	-	0,5	ID	-
41	5	5	5	5	0,5	-	0,5	IM	S ₂
55	5	5	5	5	0,5	-	0,5	IM	-
62	5	5	5	5	0,5	-	0,5	ID	S ₃
97	5	5	5	5	0,5	-	0,5	IM	S ₄
122	5	5	5	5	0,5	-	0,5	IM	S ₅

PSB: Proteína Soluble de almeja Babosa.
PSF: Proteína Soluble de almeja Fina.
PSI: Proteína Soluble de almeja Italiana.
PSR: Proteína Soluble de almeja Rubia.
SSE: Solución Salina Estéril.
ACF: Adyuvante Completo de Freund.
AIF: Adyuvante Incompleto de Freund.
ID: Inoculación Intradérmica.

IM: Inoculación Intramuscular.
S₀: Sangría inicial.
S₁: Sangría día 20.
S₂: Sangría día 41.
S₃: Sangría día 62.
S₄: Sangría día 97.
S₅: Sangría día 122.

Asimismo, a los 20, 41, 62, 97 y 122 días después de la primera inoculación, se realizaron sangrías parciales de la vena marginal de la oreja, con el fin de verificar la eficacia del proceso de inmunización (*Tabla 18*). La presencia de anticuerpos frente a PSB, PSF, PSI o PSR en el suero procedente de las sangrías parciales, se comprobó mediante la técnica de ELISA indirecto en placa.

III.3.2.2. SANGRÍA FINAL

La sangría final (S_f) de los animales se efectuó transcurridos 130 días del comienzo del proceso de inmunización, una vez comprobado, mediante la técnica de ELISA indirecto en placa, que el título de los inmunosueros era adecuado para llevar a cabo el experimento (*Figura 40*).

Para realizar la sangría final, los conejos se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/Kg de peso) por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja. A continuación, se colocaron sobre una mesa en posición de *decúbito supino*, inmovilizándoles las cuatro extremidades y seguidamente, se les introdujo una aguja (18G) entre el cuarto y el quinto espacio intercostal de la región torácica. Cuando la aguja alcanzó la posición intracardiaca, la sangre del conejo se recogió en tubos de vidrio hasta el desangrado completo del animal.

III.3.2.3. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SUERO

La sangre extraída de los conejos se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se separó cuidadosamente el coágulo de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y se mantuvieron los tubos a 4°C durante 15 h para favorecer la retracción del coágulo. El suero se trasvasó a tubos de centrifuga y se centrifugó durante 10 min a 2.000 g a una temperatura de 4°C.

El sobrenadante obtenido se dividió en alícuotas que se conservaron en viales de vidrio en congelación a -20°C hasta el momento de su utilización.

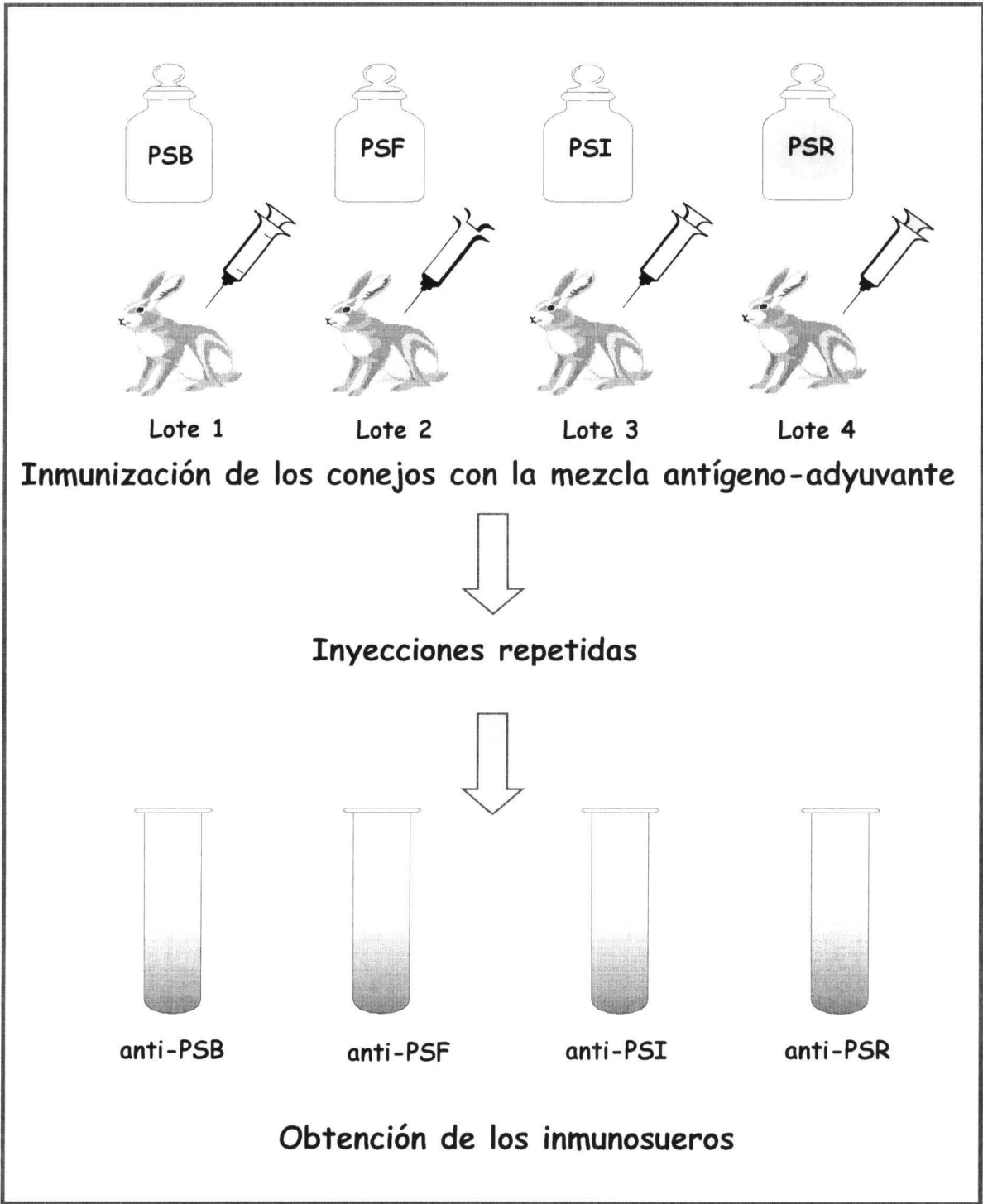


Figura 40. Obtención de los inmunosueros.

III.3.2.4. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LOS ANTICUERPOS

Los inmunosueros obtenidos frente a las proteínas solubles de almeja babosa (*anti-PSB*), fina (*anti-PSF*), italiana (*anti-PSI*) y rubia (*anti-PSR*), se purificaron parcialmente mediante precipitación selectiva con sulfato amónico al 50%.

Esta técnica es una de las más utilizadas para la separación de las proteínas de una solución acuosa. Las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a través de sus grupos polares. El método de purificación de proteínas por precipitación con sulfato amónico se basa en que cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como el amonio y el sulfato, éstos compiten con las moléculas proteicas en su unión por el agua. La solubilidad de las proteínas disminuye al perder su unión con las moléculas de agua y esto origina su precipitación.

La precipitación de las inmunoglobulinas de los sueros anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Harlow y Lane (1988):

- 10 mL de inmunosero se centrifugaron a 3.000 g durante 30 min.
- Se recogió el sobrenadante y se le añadieron, gota a gota y agitando al mismo tiempo, 10 mL de una solución saturada de sulfato amónico 4,1 M pH 7,4. A continuación, la mezcla se mantuvo en reposo durante 15 h a 4°C para permitir la precipitación de las inmunoglobulinas.
- Una vez precipitadas, la mezcla se centrifugó a 3.000 g durante 30 min y se descartó el sobrenadante.
- Las inmunoglobulinas presentes en el sedimento se resuspendieron en 5 mL de tampón fosfato salino (PBS: NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 0,0015 M; Na₂HPO₄·12H₂O 0,081 M; KCl 0,0027 M; pH 7,2) y a continuación, se dializaron en tampón PBS durante 15 h a 4°C. En la diálisis se utilizaron membranas tubulares Serva mod. 27/32.
- Una vez dializadas las muestras, las inmunoglobulinas anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR se distribuyeron en alícuotas de 1 mL, manteniéndose a -20°C hasta su utilización.

III.3.2.5. NEUTRALIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOADSORCIÓN

Una vez purificados parcialmente los anticuerpos mediante precipitación con sulfato amónico, se procedió a su neutralización selectiva utilizando la técnica de inmunoadsorción (Jones y Patterson, 1986).

Para ello, los anticuerpos anti-PSB, anti-PSI y anti-PSR diluidos 1:100, y los anticuerpos anti-PSF, diluidos 1:300 en PBSTM (tampón PBS con un 1% de Tween 20 y un 1% de leche en polvo desnatada), se mezclaron con una cantidad apropiada de los extractos antigénicos liofilizados de las especies heterólogas:

- El suero anti-PSB se neutralizó con 1 mg/mL de proteínas solubles de almeja fina (PSF), italiana (PSI) y rubia (PSR).
- El suero anti-PSF se neutralizó con 0,25 mg/mL de proteínas solubles de almeja babosa (PSB), italiana (PSI) y rubia (PSR).
- El suero anti-PSI se neutralizó con 1 mg/mL de proteínas solubles de almeja babosa (PSB), fina (PSF) y rubia (PSR).
- El suero anti-PSR se neutralizó con 0,5 mg/mL de proteínas solubles de almeja babosa (PSB), fina (PSF) e italiana (PSI).

Las mezclas de cada suero con los extractos antigénicos heterólogos se incubaron durante 1 h a 37°C y a continuación, se utilizaron en la técnica de ELISA indirecto.

III.3.3. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PLACA

En esta técnica, los antígenos de la muestra se fijan por adsorción pasiva a una superficie inerte, una placa de poliestireno de 96 pocillos. A continuación se incorporan los anticuerpos específicos, que al reconocer al antígeno quedan unidos a él. Después de un lavado que elimina las moléculas que no han reaccionado, los anticuerpos unidos al antígeno se detectan por un segundo anticuerpo, marcado con una enzima, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos. Se lava de nuevo la placa y se añade a continuación el sustrato de la enzima. La reacción se visualiza por la liberación de un compuesto coloreado al actuar la

enzima sobre su sustrato. La intensidad de color que se produce en la reacción es proporcional a la concentración del antígeno de la muestra (*Figura 17*).

Tampones y reactivos

▪ Tampón PBS (pH 7,2)

NaCl	8,0 g	(0,14 M)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,9 g	(8,1 mM)
KH ₂ PO ₄	0,2 g	(1,5 mM)
KCl	0,2 g	(2,7 mM)
Agua destilada c.s.p	1 L	

▪ Tampón PBST

Tampón PBS con un 1% de Tween 20.

▪ Tampón PBSTM

Tampón PBST con un 0,5% de leche desnatada en polvo.

▪ Solución de bloqueo

Albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en tampón PBS.

▪ Sustrato

Se utilizaron tabletas de sustrato 2,2´azino bis-(3 etil-benzotiazolina) ABTS® (Roche), disueltas en un tampón que contenía perborato sódico, ácido cítrico y fosfato disódico. Después de 30 min de incubación, el color verde desarrollado se midió en el espectrofotómetro a 405 nm.

Antígenos

En este trabajo se analizaron al menos veinte individuos de cada especie de almeja (babosa, fina, italiana y rubia). Las muestras de almejas utilizadas como antígenos en la técnica de ELISA indirecto, se prepararon como se describe a continuación: 5 g de muestra de almeja se homogeneizaron en 25 mL de solución salina (NaCl al 0,85 %) y se mantuvieron en agitación durante 2 h a 20°C en un lugar oscuro. Transcurrido este tiempo, los homogeneizados se centrifugaron a 3.500 g durante 30 min a 10°C. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron posteriormente a través de filtros de vidrio borosilicatados, empleando un aspirador

de vacío. Posteriormente, los extractos antigénicos se distribuyeron en alícuotas de 0,2 mL y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

Antes de realizar cada análisis, 100 μL de extracto proteico soluble de cada individuo se incubaron a 70°C durante 5 min y se centrifugaron a 5.000 g durante 5 min. A continuación se utilizaron los sobrenadantes, dejando en el fondo del tubo el material no disuelto.

Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti-PSB (anti-proteínas solubles de almeja babosa), anti-PSF (anti-proteínas solubles de almeja fina), anti-PSI (anti-proteínas solubles de almeja italiana) y anti-PSR (anti-proteínas solubles de almeja rubia), parcialmente purificados mediante precipitación con sulfato amónico (apartado III.3.2.4) y neutralizados selectivamente con los extractos antigénicos de las especies heterólogas (apartado III.3.2.5). También se emplearon anticuerpos anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR precipitados con sulfato amónico, pero sin neutralizar mediante la técnica de inmunoadsorción.

Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cabra, marcadas con la enzima *peroxidasa de rábano* (Dako). El conjugado se utilizó diluido 1:2.000 en tampón PBSTM.

Metodología del ELISA indirecto en placa

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 μL del antígeno correspondiente, diluido 1:200 en tampón PBS. La placa se incubó durante 1 h a 37°C , tras lo cual se lavó 10 veces con tampón PBST. A continuación, se añadieron 200 μL de solución de bloqueo a cada pocillo, para cubrir las zonas del mismo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno. La placa se mantuvo 30 min a 37°C y posteriormente, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de solución de bloqueo. Una vez lavada la placa, se añadieron a cada pocillo 100 μL de los anticuerpos diluidos en PBSTM. La placa se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST para eliminar

aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se depositaron en cada pocillo 100 μ L del conjugado diluido en tampón PBSTM. La placa se mantuvo en el agitador de placas de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 10 veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 μ L del sustrato ABTS[®], manteniendo la placa en el agitador durante 30 min a temperatura ambiente.

El color verde resultante de la degradación del sustrato por la enzima se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En cada ensayo se realizaron los siguientes controles:

- Control de antígeno: en los pocillos se añadió únicamente solución de bloqueo, anticuerpo, conjugado y sustrato.
- Control de anticuerpo: en los pocillos solamente se añadió antígeno, solución de bloqueo, conjugado y sustrato.
- Control de conjugado: en los pocillos solamente se añadió solución de bloqueo, conjugado y sustrato.
- Control de sustrato: en los pocillos se añadió solamente solución de bloqueo y sustrato.

El experimento se consideró nulo si la absorbancia a 405 nm de alguno de los controles era mayor de 0,200.

III.3.4. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS

Tampones y reactivos

Todos los tampones y reactivos se prepararon como se describe en la sección III.3.3.

Antígenos

Las muestras de almejas utilizadas como antígenos en la técnica de ELISA en paletas se prepararon como se describe en la sección III.3.3.

Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF y anti-PSR, neutralizados mediante la técnica de inmunoadsorción (apartado III.3.2.5).

Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cabra y marcadas con la enzima *peroxidasa de rábano* (Dako), diluido 1:2.000 en PBSTM.

Sustrato

Se utilizó una solución comercial de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Roche).

Metodología del ELISA indirecto en paletas

Las paletas de poliestireno (Nunc) se introdujeron en criotubos de polipropileno (Nunc) en los que se había depositado 1 mL de la muestra antigénica correspondiente (*Figura 41*). Las muestras se incubaron durante 15 min, tiempo durante el cual se enroscaron y desenroscaron varias veces los tapones de los criotubos, con objeto de facilitar la adsorción de los antígenos a las paletas. Terminada la incubación, las paletas y los criotubos se lavaron cuidadosamente con agua corriente evitando invertir los tapones. Seguidamente, las paletas se incubaron durante 15 minutos con 1 mL de los anticuerpos policlonales neutralizados.

Finalizada la incubación, las paletas se lavaron de nuevo con agua del grifo para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se incubaron durante 15 minutos con 1 mL de conjugado diluido 1:2.000 en PBSTM. Tras lavar las paletas con agua del grifo para eliminar los restos de conjugado libre, éstas se introdujeron en un criotubo nuevo que contenía 1 mL de sustrato TMB. La reacción positiva se identificó visualmente, por el color azul desarrollado tras la degradación del sustrato por la enzima. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

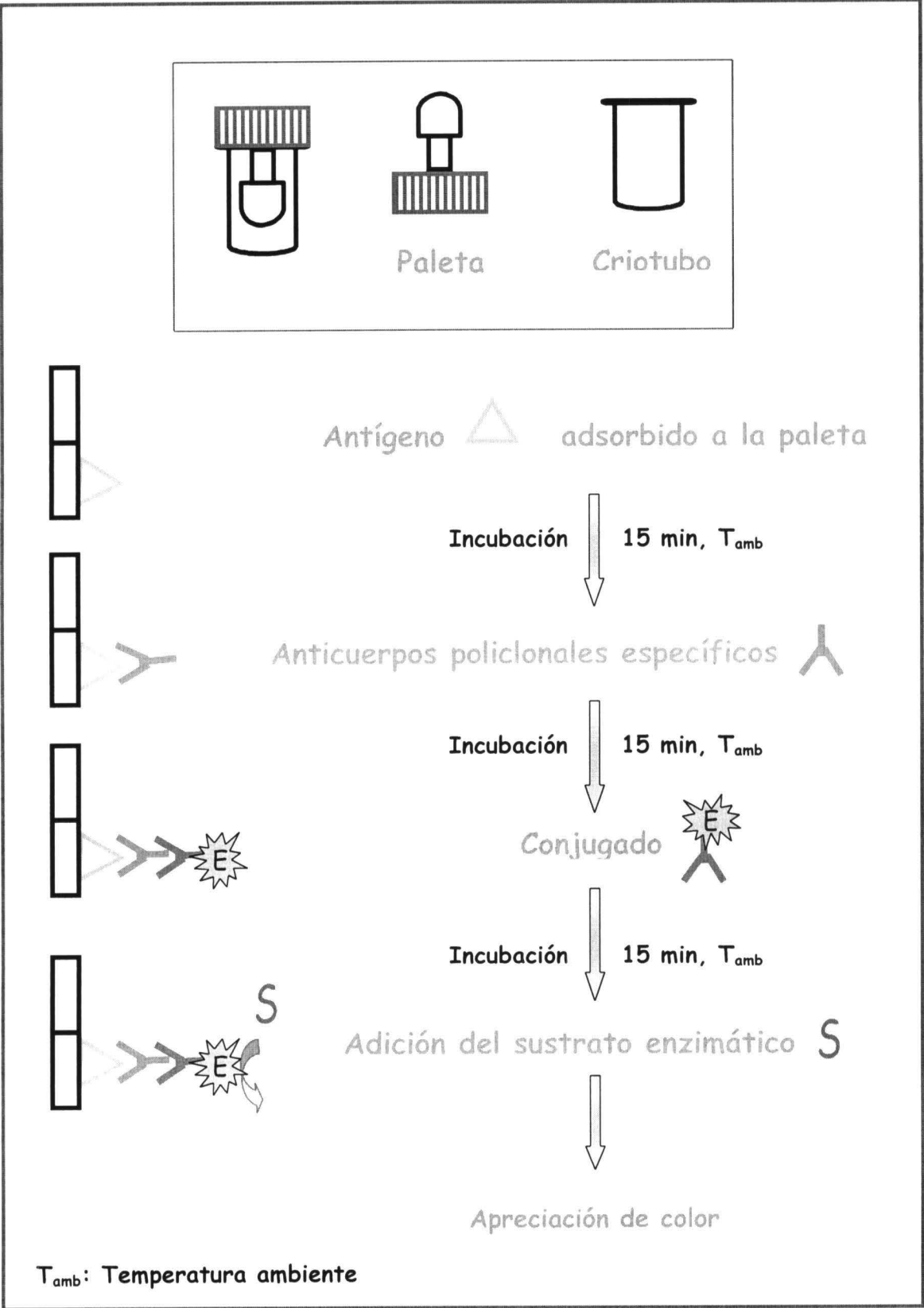


Figura 41. Técnica de ELISA indirecto en paletas.

III.3.5. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para la obtención de anticuerpos monoclonales se siguió la técnica descrita por Köhler y Milstein (1975). Estos anticuerpos, a diferencia de los policlonales, proceden de un único clon de linfocitos B y por tanto, al ser su afinidad y especificidad idénticas, constituyen un reactivo homogéneo del que puede disponerse de forma ilimitada.

A continuación, se explican cada una de las etapas para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina (*Figura 42*).

III.3.5.1. PAUTA DE INMUNIZACIÓN

Para la producción de anticuerpos monoclonales se utilizaron dos lotes de cuatro ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad y 20-25 g de peso. El primer lote se inmunizó con extracto proteico liofilizado de almeja fina (PSF), y el segundo lote se inmunizó con extracto proteico obtenido de almeja fina, pero sin liofilizar (PSF2), obtenidos según se describe en el apartado III.3.1.1. La inmunización del primer lote comenzó con la inoculación intraperitoneal del extracto antigénico PSF (1 mg de proteína/animal) emulsionado en 0,15 mL de Adyuvante Completo de Freund y 0,15 mL de solución salina estéril (NaCl al 0,85%). Sin embargo, la inmunización del segundo lote se realizó con 0,15 mL de extracto proteico PSF2, emulsionado en 0,15 mL de Adyuvante Completo de Freund. Las inoculaciones intraperitoneales se prolongaron durante 4 meses a intervalos de 2-3 semanas, utilizando el Adyuvante Incompleto de Freund, en lugar del Completo, a partir de la segunda inoculación.

Antes de la primera inoculación del antígeno y, para comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente al inmunógeno utilizado, se realizó una sangría inicial (S_0). La sangre obtenida se mantuvo 1 h a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se centrifugó a 3.000 g durante 10 min y el suero obtenido se mantuvo a -20°C hasta su utilización. Asimismo, a los 42 días de la primera inoculación se realizó una sangría parcial (S_1) cortando un pequeño fragmento de la cola del ratón, con el fin de verificar la eficacia del proceso de inmunización.

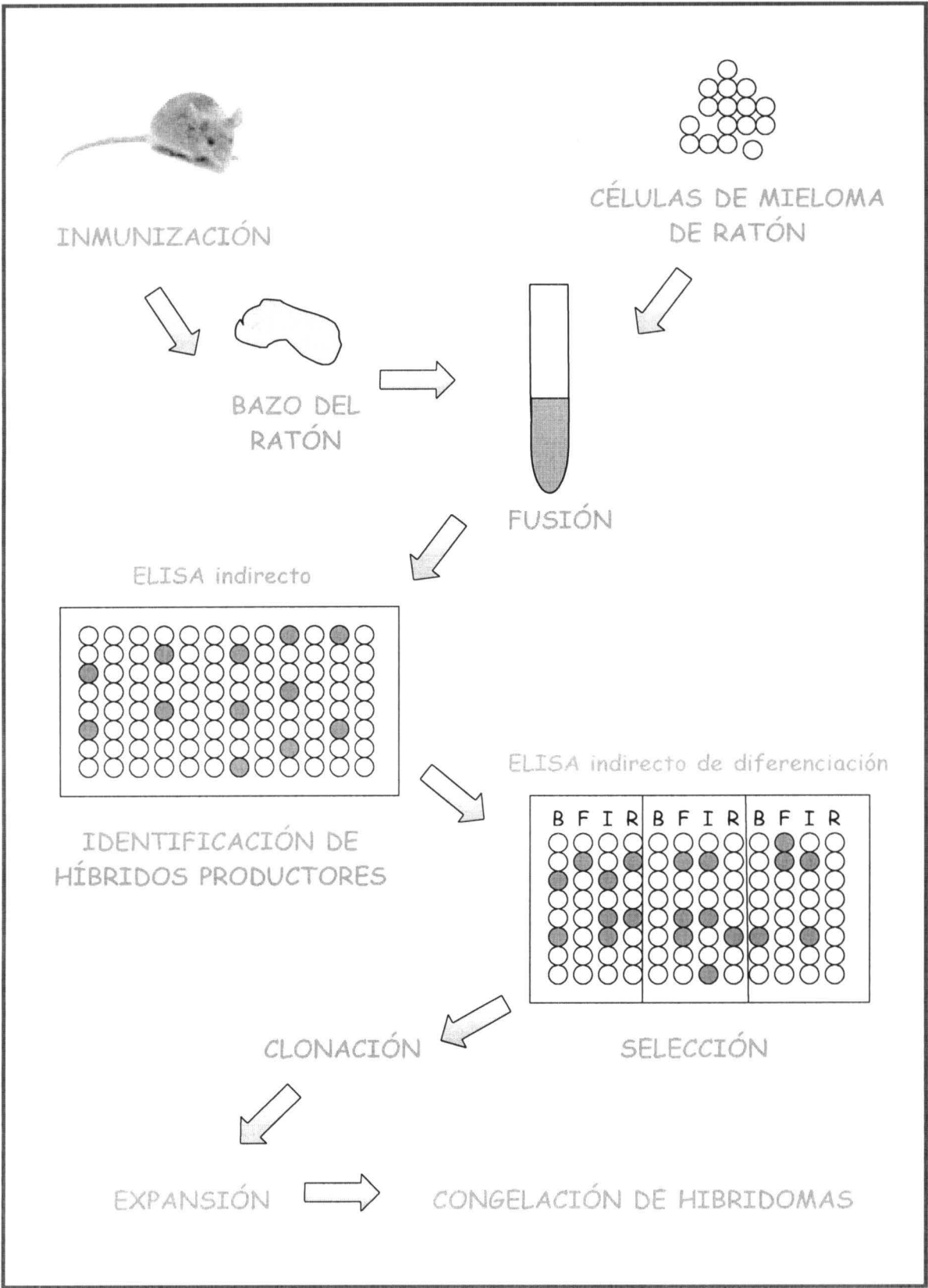


Figura 42. Protocolo de obtención de anticuerpos monoclonales.

Para comprobar la producción de anticuerpos frente a las proteínas solubles de almeja fina, se utilizó la técnica de ELISA indirecto en placa, empleando los inmunosueros resultantes de las sangrías parciales realizadas a los ratones. Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras de inmunosueros, demostraron que el título de los mismos era adecuado para proceder a la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina.

III.3.5.2. FUSIÓN CELULAR

Se basa en el mecanismo de producción de “hibridomas” descrito por Köhler y Milstein en 1975, y por el que obtuvieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. La técnica consiste en la fusión de linfocitos B, que proceden del bazo de un ratón inmunizado, con células de mieloma de ratón (células tumorales de la médula ósea, que crecen indefinidamente en un medio de cultivo celular). Las células resultantes de la fusión de los linfocitos del bazo y de las células de mieloma, denominadas “hibridomas”, heredan la capacidad de producir anticuerpos del linfocito, y la capacidad de sobrevivir “in vitro” del mieloma.

Tres días antes de la fusión celular se realizó una última inoculación intraperitoneal del antígeno al ratón que se había seleccionado por presentar una mayor concentración de inmunoglobulinas en el suero. El día de la fusión celular, el ratón seleccionado se sacrificó mediante dislocación cervical y se procedió a la extracción del bazo. A continuación, el bazo se troceó y disgregó presionando los distintos fragmentos resultantes con un émbolo de jeringa sobre una rejilla estéril de nylon. Los linfocitos así obtenidos se resuspendieron en 10 mL de un medio de cultivo celular SFRPMI [RPMI-1640 + L-Glutamina (1%) + Penicilina-Estreptomicina 10.000 UI/mL (1%)] y la suspensión celular resultante se centrifugó a 400 g durante 5 min. Una vez terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 mL del medio SFRPMI, y de éstos, se tomó una alícuota para teñirla con una solución de tripán azul (0,2%) y ácido acético (1%) en un tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2). Finalmente, se realizó el recuento de las células al microscopio utilizando una cámara de Neubauer.

Las células de mieloma de ratón que se emplearon en la fusión (P3X63-Ag 8.653), permanecían congeladas a -85°C , a una concentración de 5×10^6 células/mL. Estas células se descongelaron 8 días antes de la fusión en un baño

termostatado a 37°C, repartiéndose en frascos de cultivo celular en alícuotas de 0,5 mL de volumen, a los que se añadían 25 mL de CRPMI [RPMI-1640 + Suero fetal bovino (FCS, 15%) + L-Glutamina (1%) + Penicilina-Estreptomicina 10.000 UI/mL (1%)]. Con objeto de revitalizar las células, los frascos se incubaron en una estufa de cultivo celular a 37°C con un 5% de CO₂ durante 48 h. Una vez que las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico, y la imagen microscópica del cultivo celular se apreciaba como una monocapa, las células se despegaron con una pipeta de las paredes del frasco, y se centrifugaron a 400 g durante 5 min. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 10 mL del medio SFRPMI, se realizó una segunda centrifugación a 400 g durante 5 min, de nuevo se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en el mismo medio. Posteriormente, se tomó una alícuota que se tiñó con una solución de tripán azul (2%) en tampón PBS, y se contaron las células empleando una cámara de Neubauer.

A continuación, en un tubo de centrífuga de 50 mL de capacidad, se mezclaron la suspensión de linfocitos y la de células de mieloma en una proporción de 5:1, y la mezcla se centrifugó a 400 g durante 5 min. Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular resultante se resuspendió en 10 mL de SFRPMI. El proceso se repitió dos veces más, dejando tras la última centrifugación el sedimento celular bien escurrido.

La fusión de los linfocitos con las células de mieloma de ratón, se realizó en presencia de polietilenglicol 1.500 MW (PEG). El PEG fusiona las membranas plasmáticas adyacentes, formando una única célula con dos o más núcleos. Estos núcleos permanecen hasta que las membranas nucleares se disuelven antes de la mitosis. Para la fusión, se añadió lentamente al sedimento celular (mezcla de linfocitos y de células de mieloma) 1 mL de PEG calentado previamente a 37°C. Después de agitar con cuidado durante 30 s, se añadió gota a gota 1 mL de medio SFRPMI durante 1 min. En los 3 min siguientes, se añadieron 3 mL de SFRPMI, y pasado ese tiempo, se añadieron 16 mL de SFRPMI durante 6 min. La suspensión celular resultante, se incubó en una estufa de cultivo celular a 37°C con 5% de CO₂ durante 15 min. Después de centrifugar una vez más la suspensión celular a 400 g durante 15 min, el sedimento compuesto de linfocitos, células de mieloma e

hibridomas se resuspendió en 50 mL de CRPMI suplementado con un promotor del crecimiento celular, BM (Roche), al 10%. A continuación, el medio que contenía las células se distribuyó en 6 placas de cultivo estériles de 96 pocillos, a razón de 100 μ L por pocillo. Las placas se incubaron 12 h en una estufa de cultivo celular a 37°C y con un 5% de CO₂.

III.3.5.3. SELECCIÓN DE LOS HIBRIDOMAS

La selección de los hibridomas se realizó según el protocolo descrito por Littlefield (1964). Para que los hibridomas resultantes de la fusión celular puedan crecer en el medio de cultivo, es preciso eliminar las células de mieloma. Para ello, las células de mieloma que se emplearon en la fusión se seleccionaron previamente para que tuvieran afuncional una enzima denominada hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT), que interviene en una ruta de recuperación de las bases púricas. Si además, añadimos aminopterina en el medio de crecimiento de los hibridomas, ésta bloquea la ruta biosintética principal de los ácidos nucleicos. Por tanto, las células de mieloma morirán, puesto que carecen de la capacidad de sintetizar material genético, ya sea por la ruta principal que está bloqueada, como por la ruta alternativa de la que carecen, al no tener la enzima necesaria. Sin embargo, las células de hibridoma no mueren, al contener de los linfocitos el gen de la HGPRT intacto, disponiendo de la enzima funcional (*Figura 43*).

Por consiguiente, una vez que las placas se incubaron 12 h en una estufa a 37°C con 5% de CO₂, se añadió a cada uno de los pocillos de las placas de cultivo celular, 100 μ L de un medio selectivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) al 2%. Las células se mantuvieron en este medio durante 14 días, después de los cuales, se procedió a sustituir el medio HAT por otro medio selectivo HT (Hipoxantina-Timidina). Después de mantener las células durante una semana en medio HT, éste se sustituyó por CRPMI.

Una vez realizada la fusión, con independencia del medio en el que se mantienen las células, es preciso eliminar los productos de desecho segregados por las células al medio y restituir los nutrientes que éstas requieren en su crecimiento.

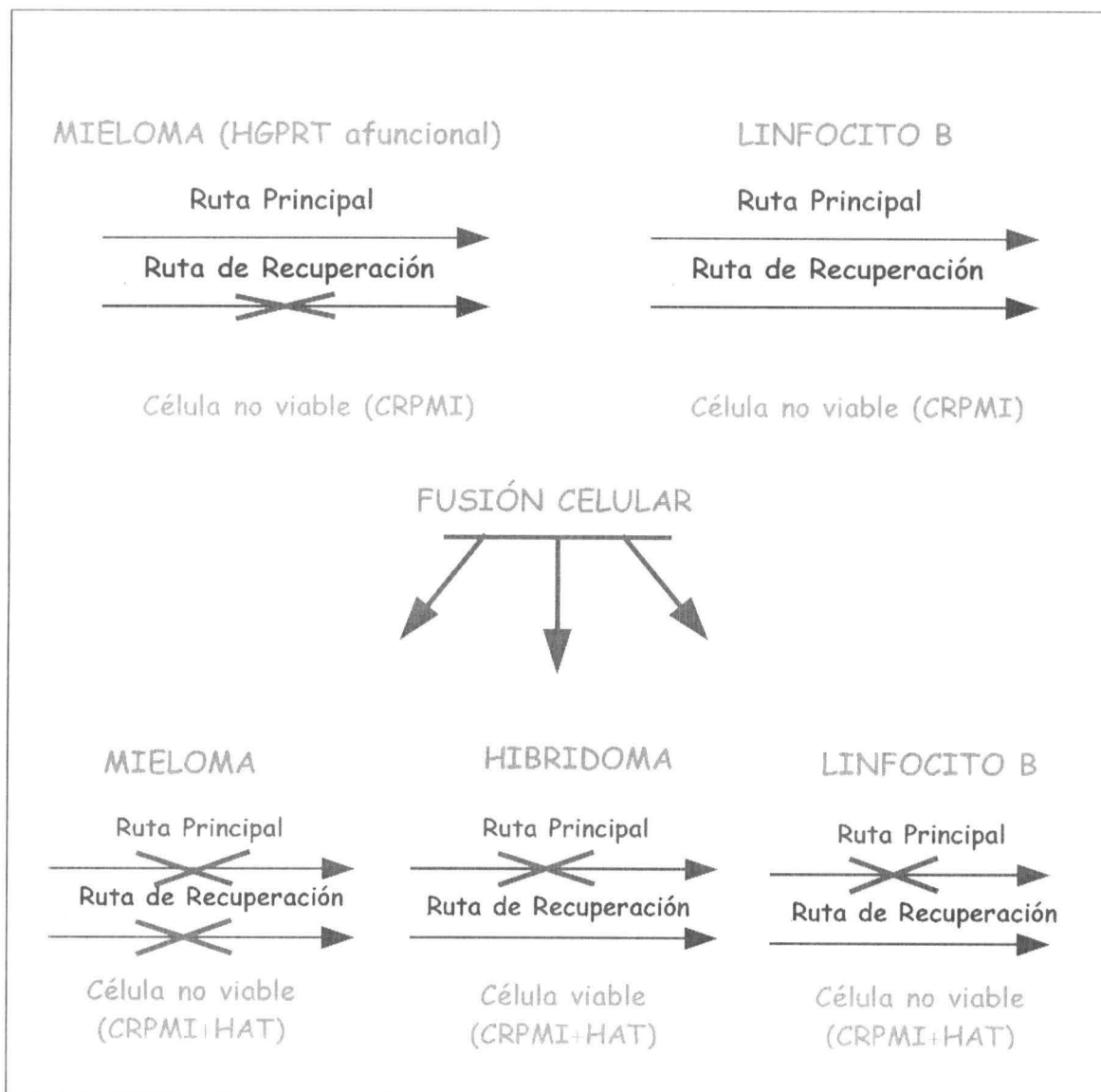


Figura 43. Mecanismos de selección de las células resultantes de la fusión entre linfocitos y las células de mieloma de ratón (P3X63-Ag 8.653) utilizando la aminopterina, de acuerdo al mecanismo descrito por Littlefield (1964).

Para ello, se elimina la mitad del medio de cultivo de cada pocillo (100 μ L) utilizando una micropipeta automática, y a continuación, se reemplaza con medio fresco (100 μ L). Esta "alimentación" de las células se efectúa en condiciones normales cada dos días, aunque si las células crecen rápidamente y el cultivo se densifica, es preciso realizarla con mayor frecuencia.

III.3.5.4. EVALUACIÓN DE LOS HIBRIDOMAS

Dos semanas después de la fusión celular, se procedió a evaluar en los sobrenadantes de los pocillos la presencia de anticuerpos producidos por los hibridomas frente al extracto proteico de almeja fina (*R. decussatus*). Con este fin, se tomaron alícuotas del medio de crecimiento de los hibridomas y se detectó la presencia de dichos anticuerpos utilizando la técnica de ELISA indirecto. Para ello, los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 μ L del extracto proteico de almeja fina, diluido 1:500 en tampón PBS. La placa se incubó durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavó 10 veces con tampón PBST. A continuación, se añadieron 200 μ L de solución de bloqueo a cada pocillo, para cubrir las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno. La placa se mantuvo 30 min a 37°C y posteriormente, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de solución de bloqueo. Una vez lavada la placa, se añadieron 25 μ L de sobrenadante de los pocillos y 75 μ L de PBSTM a cada pocillo. La placa se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ L del conjugado (anti-inmunoglobulinas de ratón obtenido en conejo, y conjugado con peroxidasa de rábano) diluido 1:2.000 en tampón PBSTM. La placa se mantuvo en el agitador de placas de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 10 veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 μ L del sustrato ABTS[®], manteniendo la placa en el agitador durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

Para la identificación de hibridomas productores de anticuerpos específicos frente a proteínas solubles de almeja fina, se realizó un ELISA indirecto de diferenciación. En esta técnica, el sobrenadante de los pocillos que resultaron positivos en el ELISA indirecto anterior se enfrentó a las proteínas solubles de las cuatro especies de almejas objeto de estudio: almeja babosa, fina, italiana y rubia. Para ello, se procedió según la metodología explicada anteriormente, pero en este caso se emplearon como antígenos los de las cuatro especies de almejas, cada

uno de los cuales se fijó en pocillos independientes de la placa de ELISA. Posteriormente, a cada uno de los pocillos tapizados con extractos antigénicos de almeja fina, babosa, italiana y rubia se añadieron 20 μL del sobrenadante del pocillo positivo de las placas de cultivo de hibridomas y 80 μL de PBSTM, con el fin de estudiar la especificidad de los anticuerpos frente a los extractos proteicos de la especie de almeja *R. decussatus*.

Metodología del ELISA sandwich

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 μL de inmunoglobulinas antiratón obtenidas en cabra (DAKO) diluidas 1:500 en tampón PBS. La placa se incubó durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavó 10 veces con tampón PBST. A continuación, se añadieron 200 μL de solución de bloqueo a cada pocillo, para cubrir las zonas del pocillo en las que no se hubieran adsorbido las inmunoglobulinas. La placa se mantuvo 30 min a 37°C y posteriormente, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de solución de bloqueo. Una vez lavada la placa, se añadieron 25 μL de sobrenadante de los pocillos que resultaron positivos en el ELISA indirecto y 75 μL de tampón PBSTM. La placa se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se añadieron 100 μL de extracto antigénico de cada especie de almeja (PSB, PSF, PSI y PSR) en dilución 1:200, cada uno de los cuales se fijó en pocillos independientes de la placa de ELISA. Tras incubar las placas en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, éstas se lavaron 10 veces con tampón PBST y se añadieron 100 μL de anticuerpos policlonales (anti-PSF) diluidos 1:300 en PBSTM. La placa se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón PBST y se añadieron 100 μL del conjugado anticonejo diluido en tampón PBSTM. La placa se mantuvo en el agitador de placas de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 10 veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 μL del sustrato ABTS[®], manteniendo la placa en el agitador durante 30 min a temperatura ambiente. El color verde resultante de la

degradación del sustrato por la enzima se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

III.3.5.5. CLONACIÓN DE LOS HIBRIDOMAS

Una vez identificados los hibridomas productores de los anticuerpos de interés, hay que asegurar su crecimiento estable a lo largo del tiempo. Los pocillos de las placas de cultivo suelen contener más de un clon de hibridomas. Muchos de estos clones poseen un material genético inestable que impide que produzcan anticuerpos, y si estos clones sobrecrecen, se pueden perder aquellos hibridomas que producían los anticuerpos monoclonales de interés. Mediante la clonación, se pretende diluir la mezcla inicial de clones hasta conseguir aislar una colonia de células que proceda de un solo clon de hibridoma productor de anticuerpo, y poder asegurar así la secreción estable del anticuerpo.

Para realizar la clonación, se empleó la técnica de dilución límite descrita por Harlow y Lane (1988). Una vez identificados los hibridomas productores de los anticuerpos de interés, se tomó un volumen inicial del medio donde crecían los hibridomas, y se contó el número de células que contenía. A continuación, se transfirió a la primera columna de una nueva placa de cultivo de 96 pocillos el volumen de suspensión celular, necesario para conseguir cien células por pocillo. A partir de la primera columna, se hicieron diluciones sucesivas hasta el final de la placa, con el fin de conseguir en las últimas columnas una densidad celular inferior a una célula por pocillo.

Si la clonación es efectiva, en las últimas columnas de la placa se llegan a encontrar concentraciones de una sola célula por pocillo como máximo. Incluso si se parte de una suspensión de origen unicelular, antes de distribuir el hibridoma en la placa de clonación, no hay muchas garantías de que las colonias no surjan de dos células que estaban juntas. Por consiguiente, para generar el clon es conveniente repetir la clonación. Así, se repite el proceso tres veces hasta demostrar, mediante la técnica de ELISA indirecto, que los últimos pocillos de la placa que contenían un número menor de células eran también los últimos pocillos donde la reacción colorimétrica tenía lugar como consecuencia de la actividad del anticuerpo.

III.3.5.6. EXPANSIÓN Y CONGELACIÓN DE LOS HIBRIDOMAS

Una vez asegurado el origen unicelular del clon de hibridoma productor del anticuerpo específico, se realizan subcultivos en CRPMI suplementado con un 10% de BM, transfiriendo las células desde las placas de 96 pocillos a placas de 24 pocillos y de éstas a otras de 6 pocillos y a frascos de cultivo de 25 cm² de superficie. Finalmente, se transfieren las células a frascos de cultivo de 80 cm². El objetivo es conseguir la multiplicación de la línea celular para obtener anticuerpos monoclonales y disponer de un volumen de células suficiente para conservar el hibridoma productor en congelación por un tiempo indefinido.

Para congelar los hibridomas, éstos recogen de los frascos de cultivo utilizando una pipeta pasteur de plástico estéril, y a continuación la suspensión celular se centrifuga a 400 g durante 5 min. Tras la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en una solución que contiene 90% de suero fetal bovino (CFS) y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a la concentración de 5×10^6 células/mL. Esta suspensión se distribuye en criotubos en alícuotas de 1 mL, y éstos se conservan a -85°C.

Capítulo IV

RESULTADOS

IV.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA (*V. pullastra*), FINA (*R. decussatus*), ITALIANA (*R. philippinarum*) Y RUBIA (*V. rhomboides*) MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS

El primer paso para llevar a cabo la identificación genética de las almejas babosa, fina, italiana y rubia, fue la selección de marcadores genéticos y el diseño de cebadores apropiados. Además, se procedió a poner a punto los métodos de extracción del ADN y ARN a partir de las muestras de almejas. Para ello, se seleccionaron diversos protocolos recogidos en la bibliografía, optando finalmente por los métodos de extracción del ADN y ARN que proporcionaron los mejores resultados. Una vez amplificados por PCR los fragmentos de ADN seleccionados, la identificación de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia se llevó a cabo utilizando técnicas genéticas complementarias como RFLP, SSCP y RT-PCR. A continuación, se describen detalladamente los resultados obtenidos con cada uno de los métodos empleados.

IV.1.1. DISEÑO DE CEBADORES

IV.1.1.1. GEN α -ACTINA

Los cebadores act-2 y act-4 se seleccionaron a partir de los datos recogidos en la bibliografía (Watabe y col., 1995). En la sección III.2.2.1.1. se muestran las secuencias de los cebadores seleccionados.

Los oligonucleótidos act-5 y act-6 cuyas secuencias se muestran en la sección III.2.2.1.2, se diseñaron basándonos en las secuencias del fragmento amplificado de 521 pb del gen α -actina en la almeja babosa, fina, italiana y rubia. Mediante el programa PILEUP del paquete informático GCG se compararon las secuencias obtenidas en las especies de almejas babosa, fina e italiana, y se buscaron las zonas del fragmento del gen α -actina que fueran más conservadas en las citadas especies. El diseño de cebadores se llevó a cabo gracias a los programas PRIME del paquete informático GCG y el programa AMPLIFY (Engels, 1992). Los parámetros opcionales seleccionados en el programa fueron:

- longitud del fragmento amplificado: 150-200 pb

- Tm: 50-65°C
- diferencia en Tm de los cebadores: < 2°C

La localización de los cebadores act-5 y act-6 en las secuencias del gen α -actina de almeja babosa, fina e italiana amplificadas con los cebadores act-2 y act-4, correspondieron a los nucleótidos 107-126 y 231-250, respectivamente (*Figura 54*).

IV.1.1.2. ESPACIADOR INTERNO DE LA TRANSCRIPCIÓN (ITS)

Los oligonucleótidos ITS-1 e ITS-2 se seleccionaron a partir de la bibliografía existente (Heath y col., 1995). Sus secuencias se muestran en la sección III.2.2.2.

Los cebadores ITS-3 e ITS-4, se diseñaron a partir de las regiones conservadas de las secuencias parciales obtenidas con los productos de PCR amplificados previamente con los cebadores ITS-1 e ITS-2. Los cebadores ITS-3/ITS-4 fueron necesarios para analizar y completar las secuencias de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ITS-1/ITS-2. El diseño de los cebadores se realizó mediante la comparación de secuencias con el programa PILEUP y utilizando los programas de diseño de cebadores PRIME, del paquete informático GCG, y AMPLIFY. Las secuencias de los cebadores ITS-3 e ITS-4 se muestran en la sección III.2.8.3.

La localización de los cebadores ITS-4 e ITS-3 (cuyas secuencias son inversas y complementarias entre sí), corresponden a los nucleótidos 721-753 en la almeja babosa (*Figura 64*), 836-868 en almeja fina (*Figura 65*) y 755-787 en almeja italiana (*Figura 66*).

IV.1.1.3. GEN 16S ARNr

Los cebadores utilizados para amplificar el gen mitocondrial 16S ARNr se seleccionaron a partir de los datos disponibles en la bibliografía (Palumbi y col., 1991). Las secuencias de dichos cebadores se muestran en la sección III.2.2.3.

IV.1.1.4. GEN ARGININA QUINASA

Los oligonucleótidos AKrna, oligo-dT-adaptor y AKom se diseñaron a partir de las secuencias existentes en la bibliografía (Suzuki y Furukohri, 1994).

El cebador AKrna se diseñó a partir de las secuencias de una región conservada de las enzimas fosfagen quinasa de vertebrados (creatina quinasa de humanos, conejo, pollo) e invertebrados (glicociamina quinasa de la especie de anélido *Neanthes diversicolor*, y arginina quinasa del molusco *Nordotis madaka* y del artrópodo *Penaeus japonicus*). Para el diseño del cebador AKom, se utilizaron las siguientes secuencias de moluscos de las bases de datos GenBank y EMBL:

AB017255 *Pseudocardium sachalinensis*, secuencia completa del ADNc que codifica para la enzima arginina quinasa (2.654 pb).

AB008011 *Battilus cornutus*, secuencia completa del ADNc que codifica para la enzima arginina quinasa (1.626 pb).

Utilizando los programas PRIME y AMPLIFY, se diseñó el cebador AKom capaz de amplificar junto con el oligonucleótido AKrna, un fragmento de 300 pb del gen que codifica la enzima arginina quinasa de las almejas babosa, fina, italiana y rubia. Las secuencias de los oligonucleótidos AKrna y AKom se muestran en la sección III.2.2.4.1.

Tras la secuenciación del fragmento de 300 pb obtenido con la pareja de cebadores AKrna/AKom, se localizaron con el programa PILEUP las regiones conservadas de las secuencias obtenidas en las cuatro especies de almejas, y mediante los programas PRIME y AMPLIFY se diseñó el cebador AKalm. El cebador oligo-dT-adaptor fue diseñado por Suzuki y Furukohri (1994), para obtener la secuencia del extremo 3' del gen que codifica las enzimas fosfagen quinasa en invertebrados. Sus secuencias se muestran en la sección III.2.2.4.2.

IV.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción del ADN a partir de las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia, se estudió la validez de los 7 métodos descritos en el apartado III.2.3.1. Para ello, se determinó la integridad, el grado de pureza y la concentración de los ADNs obtenidos con cada método. Asimismo, se comprobó si a partir del ADN obtenido según los diferentes protocolos de extracción, era posible la amplificación por PCR de un fragmento de 521 pb del gen α -actina en las especies de almejas objeto de estudio. En la *Tabla 19* se

recogen los resultados obtenidos tras repetir al menos 3 veces cada uno de los protocolos, analizándose por duplicado las muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia.

Tabla 19. Extracción del ADN a partir de muestras de almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), empleando diversos métodos de extracción.

	Pureza		Concentración (ng/ μ L)	Integridad	Amplificación por PCR
	A_{260nm}	A_{230nm}			
	A_{280nm}	A_{260nm}			
DeSalle y col., 1993	1,8-2,0	> 0,7	800-1.300	íntegros	NO
Borgo y col., 1996	1,6-1,7	> 0,7	100-200	degradados	NO
Jones y col., 1993	< 1,7	> 0,7	300-800	degradados	NO
Patwary y col., 1996	< 1,6	> 0,7	500-800	degradados	NO
Bagshaw, 1991	1,8-2,0	0,3-0,6	1.000-2.500	íntegros	SÍ
QIAamp TISSUE KIT	< 1,6	> 0,7	300-500	degradados	NO
Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food	1,8-2,0	0,3-0,6	100-500	íntegros	SÍ

Con el método de extracción de DeSalle y col. (1993), la concentración del ADN en las muestras de almejas, estimada a partir de la absorbancia a 260 nm fue de 800-1.300 ng/ μ L. Las relaciones de absorbancia A_{260nm}/A_{280nm} estaban comprendidas entre 1,8-2,0 y las de A_{230nm}/A_{260nm} fueron superiores a 0,7. El ADN extraído estaba bastante íntegro (*Figura 44*), aunque no se amplificó el fragmento del gen α -actina a partir del ADN de muestras de almejas.

El ADN extraído con el método de Borgo y col. (1996), mostró para las cuatro especies de almejas estudiadas, valores de absorbancia A_{260nm}/A_{280nm} 1,6-1,7 y A_{230nm}/A_{260nm} superiores a 0,7. La concentración del ADN en las muestras fue de 100-200 ng/ μ L, y en el análisis electroforético del ADN se observó un alto grado de degradación del mismo (*Figura 45*).

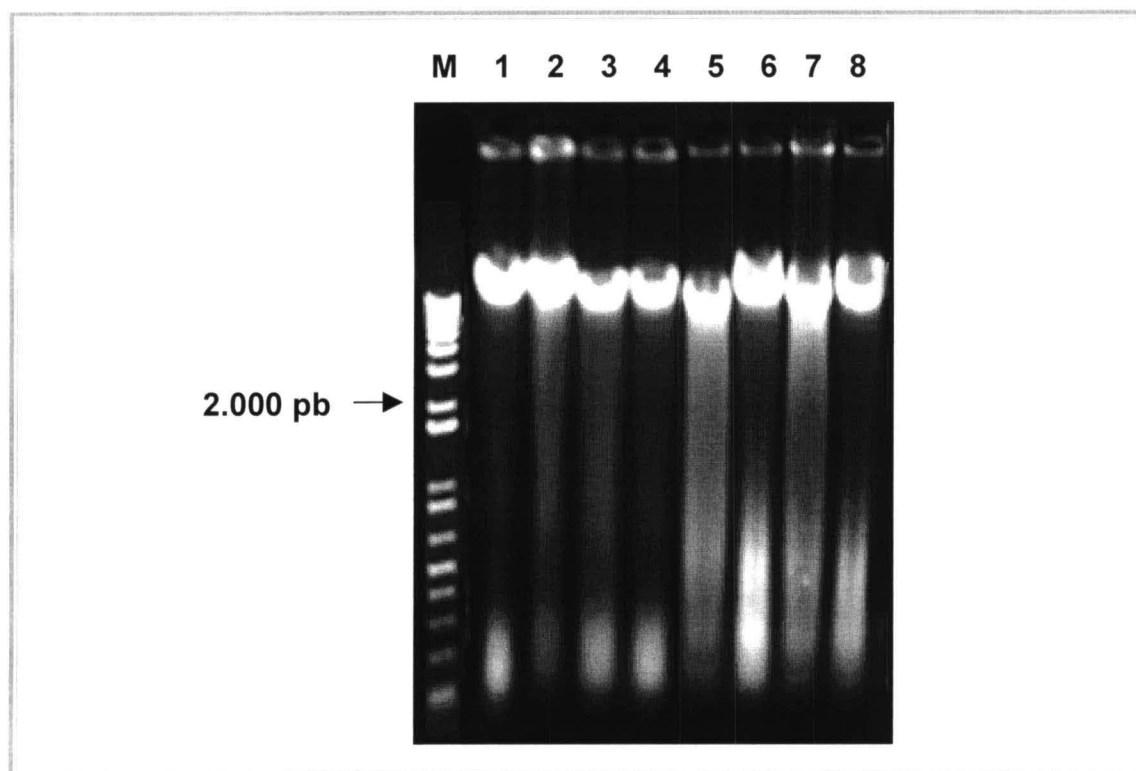


Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa del ADN de almeja babosa (1, 2), fina (3, 4), italiana (5, 6) y rubia (7, 8), obtenido empleando el método de DeSalle y col. (1993). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Gibco BRL).

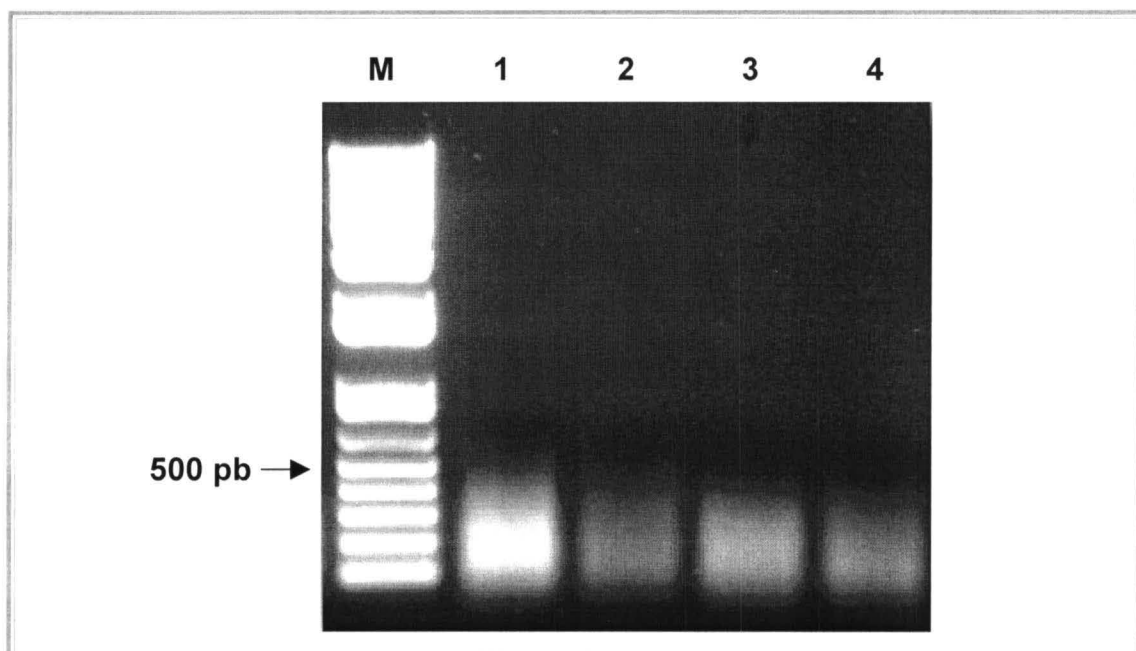


Figura 45. Análisis electroforético del ADN obtenido de muestras de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4) por el método de Borgo y col. (1996). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

Además, en ninguna de las muestras analizadas se consiguió amplificar por PCR el fragmento del gen α -actina.

Al igual que en las muestras extraídas con el protocolo de Borgo y col. (1993), el ADN obtenido con el método de extracción de Jones y col. (1993), apareció bastante degradado (*Figura 46*). La relación de los valores de absorbancia de las muestras fue $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,7$ y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}} > 0,7$, lo que induce a pensar que se extrajeron proteínas y sales junto con el ADN. La concentración del ADN fue de 300-800 ng/ μL , y no se obtuvo amplificación con la pareja de cebadores act-2/act-4.

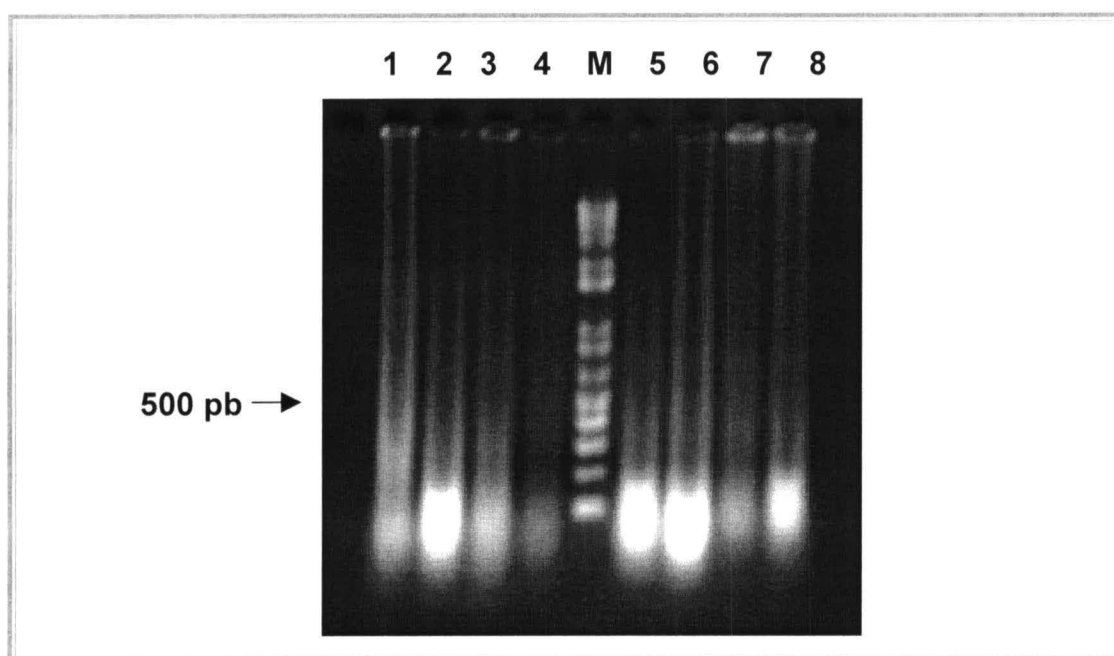


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de almeja babosa (1,2), fina (3,4), italiana (5,6) y rubia (7, 8), utilizando el método de Jones y col. (1993). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

Las muestras obtenidas siguiendo los métodos de extracción del ADN de Patwary y col. (1996) y del kit *QIAamp tissue kit*, también presentaron unas relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,6$ y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}} > 0,7$. Con el método de Patwary y col. (1996) la concentración del ADN obtenido fue de 500-800 ng/ μL y con el kit *QIAamp tissue kit* fue de 300-500 ng/ μL , pero el análisis electroforético de los ADNs obtenidos en ambos casos presentó bastante degradación (*Figuras 47 y 48*). Además, el análisis electroforético de los

productos de PCR, mostró ausencia total de amplificación con los cebadores act-2/act-4.

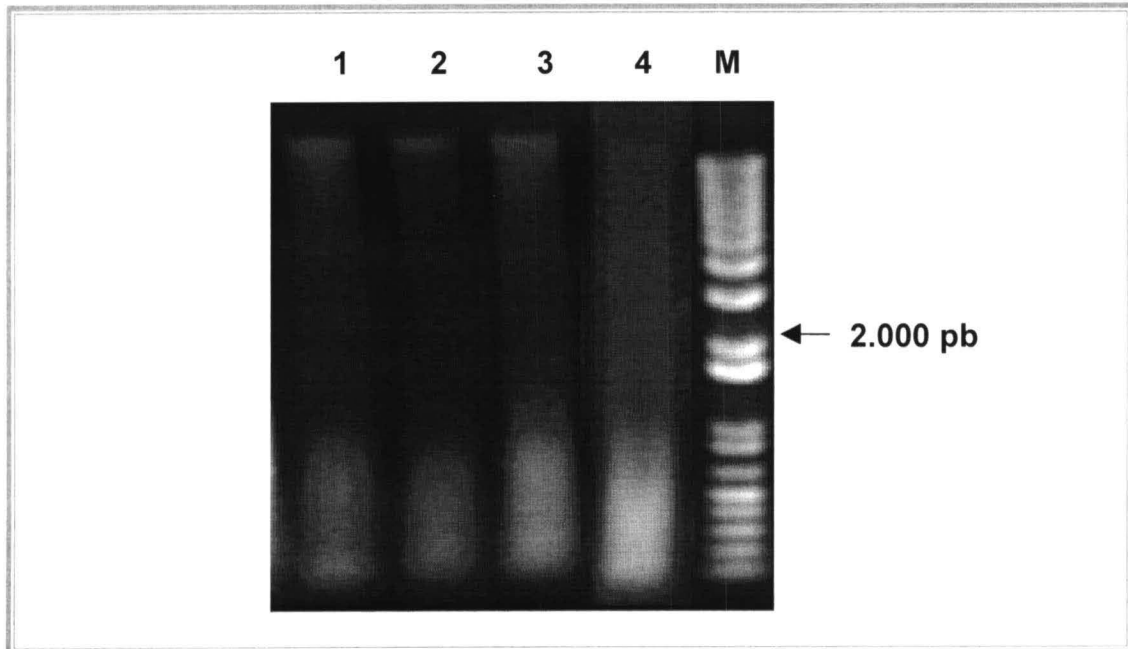


Figura 47. Electroforesis en agarosa de los ADNs obtenidos utilizando el método de Patwary y col. (1996), a partir de muestras de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

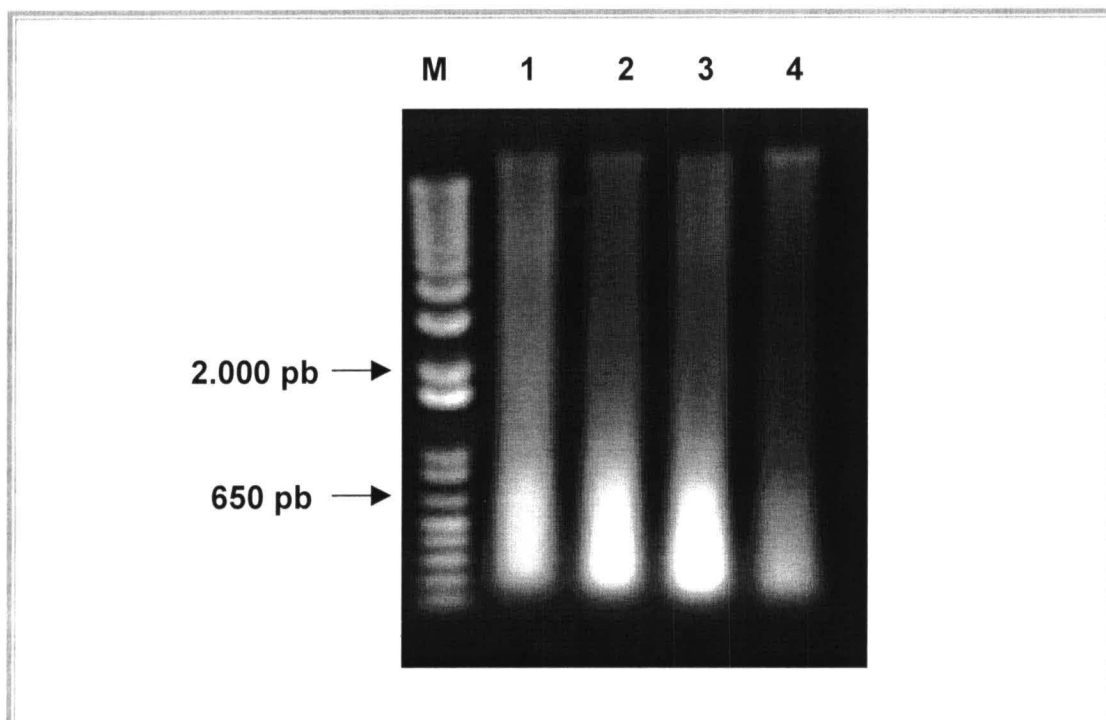


Figura 48. Análisis electroforético de los ADNs obtenidos con el método QIAamp tissue kit, a partir de las muestras de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

Mediante el método clásico de Bagshaw (1991), se obtuvo el ADN en aproximadamente 5 h tras digerir la muestra durante 6 h y tras una primera extracción de proteínas y polisacáridos durante toda la noche. El ADN extraído estaba bastante íntegro (*Figura 49*) y la concentración del ADN de las muestras (1.000-2.500 ng/ μ L) fue superior a la obtenida con el resto de los métodos analizados. No obstante, con el método de extracción *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* se extrajo también ADN íntegro (*Figura 50*), en menos de 2 h y con una concentración de 100-500 ng/ μ L. En ambos métodos, el ADN obtenido presentó una relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1,8-2,0 y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ 0,3-0,6. Con estos dos protocolos se amplificó un fragmento de 521 pb del gen α -actina en la almeja babosa, fina, italiana y rubia.

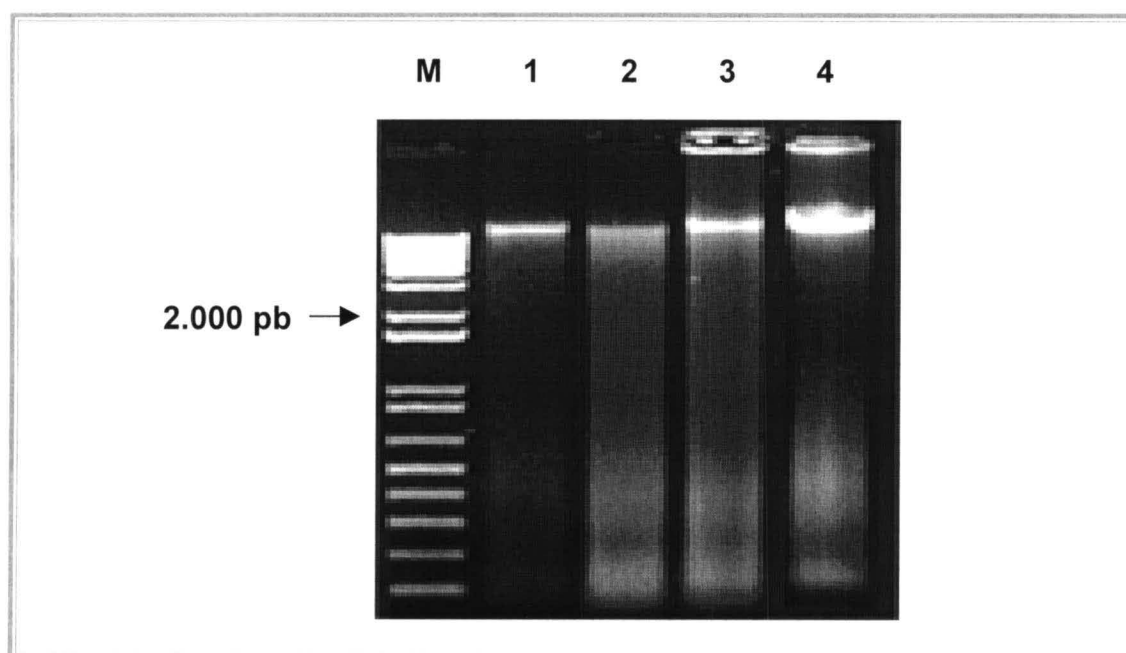


Figura 49. Electroforesis en gel de agarosa de 1.000 ng de ADN de almeja babosa (1), 500 ng de almeja fina (2) y 1.500 ng de almeja italiana (3) y rubia (4), obtenido utilizando el método de Bagshaw (1991). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

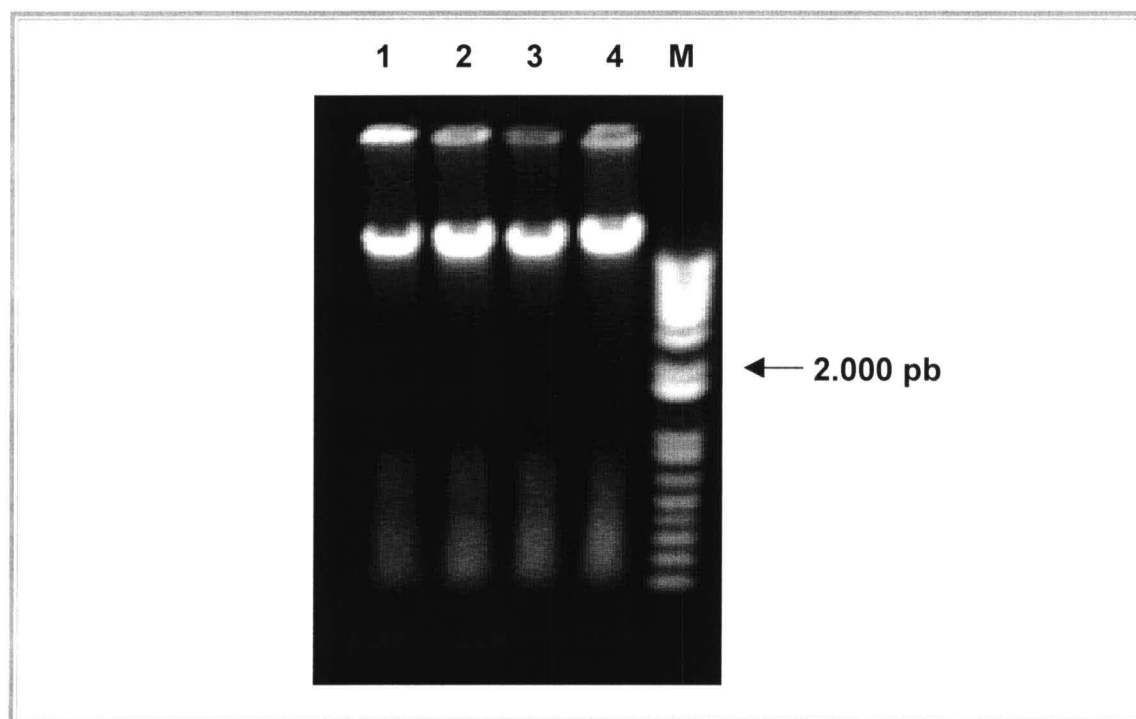


Figura 50. Análisis electroforético de los ADNs obtenidos a partir de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4), empleando el kit comercial *Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food*. M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3. EXTRACCIÓN DEL ARN

Para la extracción del ARN a partir de las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia, se utilizaron dos protocolos de extracción descritos en el apartado III.2.3.2. Una vez obtenidos los ARNs, se determinó la integridad, el grado de pureza y la concentración de los mismos.

Las muestras obtenidas se diluyeron en agua tratada con DEPC para determinar el grado de pureza del ARN extraído, y la concentración de las muestras se estimó según el valor de absorbancia a 260 nm. Ambos protocolos, permitieron la extracción del ARN total en menos de 1 h. Utilizando el protocolo de extracción del ARN total *ULTRASPEC™ RNA Isolation System* las relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ estuvieron comprendidas entre 1,6-1,9 y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ entre 0,4-0,7. Asimismo, los ARNs obtenidos empleando el kit comercial *RNeasy Mini Kit* presentaron unas relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ entre 1,5-1,9 y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ entre 0,3-0,7. Con el método *ULTRASPEC™ RNA Isolation System* la concentración del ARN total obtenido

fue de 600-1.000 ng/ μ L, mientras que con el método *RNeasy Mini Kit* fue de 100-300 ng/ μ L. Cuando se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa los ARNs obtenidos en ambos casos se observaron las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 28S y 18S (*Figuras 51 y 52*).

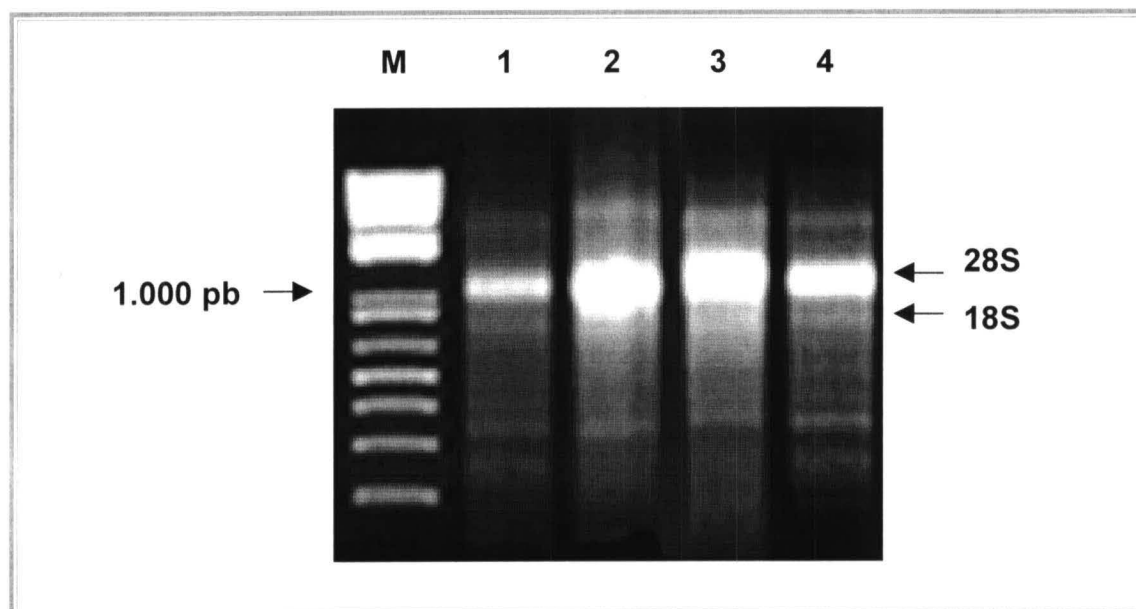


Figura 51. Análisis electroforético de los ARNs obtenidos según el método *ULTRASPEC™ RNA Isolation System*, a partir de muestras de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4). M= marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

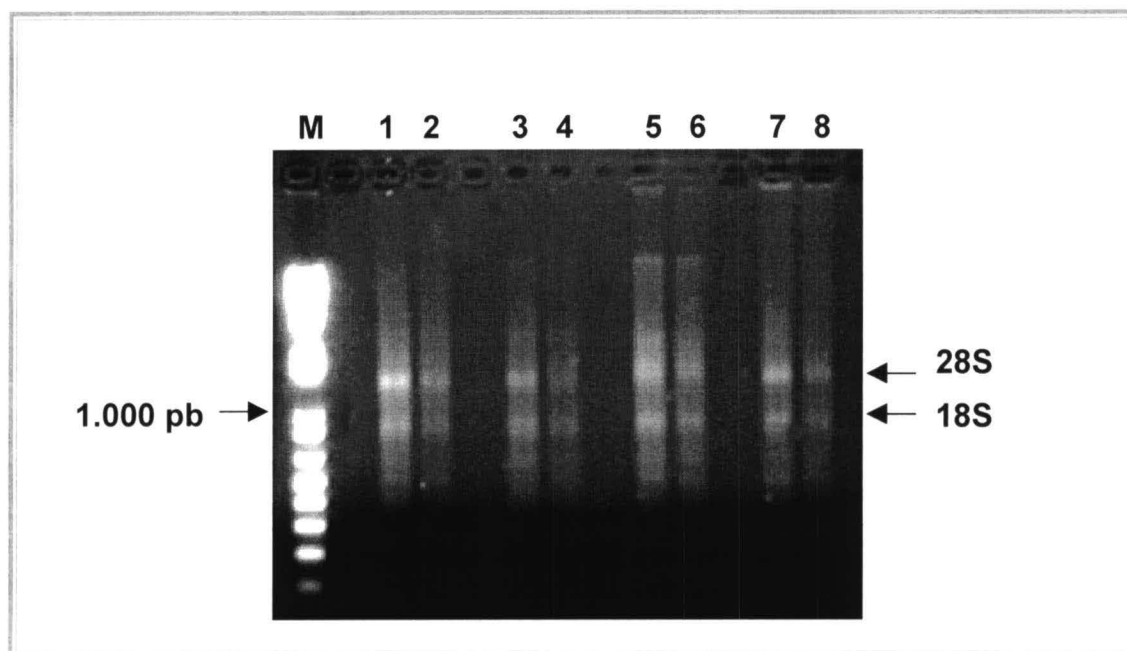


Figura 52. Electroforesis en agarosa de 500 ng y 250 ng de ARN obtenido a partir de almeja babosa (1, 2), fina (3, 4), italiana (5, 6) y rubia (7, 8), utilizando el método de extracción de ARN *RNeasy Mini Kit*. M= marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

Ambos métodos resultaron útiles para la extracción del ARN total, aunque el método *ULTRASPEC™ RNA Isolation System* resultó ser más adecuado, ya que el rendimiento fue mayor.

IV.1.4. UTILIZACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS SELECCIONADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ALMEJAS

Como marcadores genéticos para la diferenciación de las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia se seleccionaron tres marcadores nucleares (sección III.2.1.): el gen que codifica la proteína α -actina, el espaciador interno de la transcripción (ITS) y un fragmento del gen que codifica la enzima arginina quinasa. Asimismo se empleó el gen mitocondrial que codifica la subunidad 16S del ARNr.

IV.1.4.1. GEN α -ACTINA

IV.1.4.1.1. Amplificación por PCR y secuenciación

Empleando la pareja de cebadores act-2/act-4 se amplificó un fragmento de 521 pb del gen nuclear α -actina en las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia (*Figura 53*). La amplificación se llevó a cabo según las condiciones descritas en la sección III.2.6.1.1.

Los productos de PCR obtenidos a partir de una muestra de cada especie de almeja se purificaron siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.8.1., y se secuenciaron en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, donde se utilizó el secuenciador automático ABI PRISM modelo 377 y el kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing como método de secuenciación. En las reacciones de secuenciación se utilizaron los cebadores act-2 y act-4. La secuencia parcial obtenida con el oligonucleótido act-2 se superpuso con la inversa y complementaria de la obtenida con el cebador act-4, para obtener así la secuencia completa de cada producto de PCR.

Las secuencias de almeja babosa, fina, italiana y rubia se alinearon y compararon con la secuencia de ADNc de una especie de vieira (*Placopecten magellanicus*) (número de acceso U55046) obtenida de la base de datos GenBank (*Figura 54*).

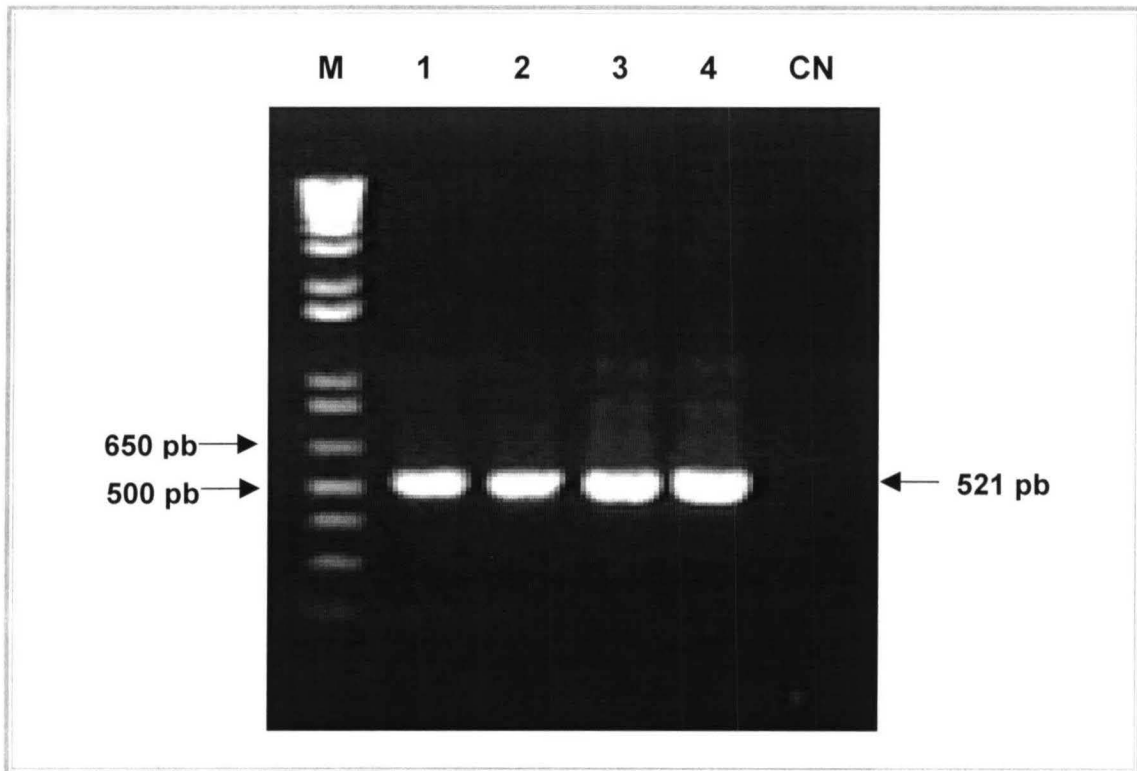


Figura 53. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen nuclear α -actina, obtenidos a partir de muestras de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder. CN= control negativo.

Figura 54. Secuencias de ADN correspondientes al fragmento del gen α -actina amplificado con los cebadores act-2/act-4, a partir de muestras de almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), alineadas con la secuencia del ADNc de vieira (*Placopecten magellanicus*) obtenida de la base de datos GenBank (U55046). La posición de los cebadores act-2 (directo) y act-4 (inverso) se indica en verde y la posición de los oligonucleótidos act-5 (directo) y act-6 (inverso) se indica en azul. Las dianas de restricción de las enzimas *Rsa* I (5'-GT↓AC-3') y *Mae* III (5'-↓GTNAC-3') se encuentran sombreadas en morado y naranja respectivamente. (N) base no identificada.

	1	cebador act-2 (dir)				Mae III	50
<i>R. philippinarum</i>		TACCTCATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGTGGT	TACTCATTCA	CaACCACCGC	
<i>V. rhomboides</i>		TACCTGATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGTGGT	TACTCATTCA	CCACCACCGC	
<i>V. pullastra</i>		TACCTGATGA	AGATCCTCAC	TGGGCGTGGT	TACTCATTCA	CCACCACCGC	
<i>R. decussatus</i>		TACCTGATGA	AGATCCTCAC	TGGGCGTGGT	TACTCATTCA	CAACCACCGC	
<i>P. magellanicus</i>		TACCTCATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGTGGT	TACTCATTCA	CCACCACCGC	
	51						100
<i>R. philippinarum</i>		TGCAACGTGA	AATTGTCAGA	GATATCAAGG	AGAAGCTTTG	CTATGTTGCT	
<i>V. rhomboides</i>		TGCAACGTGA	AATCGTCAGA	GATATCAAGG	AGAAGCTTTG	CTATGTTGCT	
<i>V. pullastra</i>		TG.AACGTGA	AATCGTCAGA	GATATCAAGG	AAAAGCTTTG	CTATGTTGCT	
<i>R. decussatus</i>		TG.AACGTGA	AATCGTCAGA	GATATCAAGG	AGAAGCTTTG	CTATGTTGCT	
<i>P. magellanicus</i>		CG.AGAGAGA	AATCGTCAGG	GACATCAAGG	AGAAACTCTG	CTATGTTGCC	
	101	cebador act-5 (dir)					150
<i>R. philippinarum</i>		CTTGACTTCG	AGCAGGAAAT	GGCCACTGCC	GCTTCTTCAT	CCTCCCTCGA	
<i>V. rhomboides</i>		CTTGACTTCG	AGCAGGAAAT	GGCCACTGCC	GCTTCATCAT	CCTCCCTCGA	
<i>V. pullastra</i>		CTTGACTTCG	AGCAGGAAAT	GGCCACTGCC	GCTTCATCCT	CCTCCCTCGA	
<i>R. decussatus</i>		CTTGACTTNG	AGCAGGAAAT	GGCCACC GCC	GCTTCATCAT	CCTCCCTNGA	
<i>P. magellanicus</i>		CTCGACTTCG	AGAACGAGAT	GGCCACC GCC	GCCTCATCCT	CATCCCTCGA	
	151					Mae III	200
<i>R. philippinarum</i>		GAAGAGCTAC	GAAGTTCCCG	ACGGACAGGT	CATCACCATC	GGTAACGAGA	
<i>V. rhomboides</i>		GAAGAGCTAC	GAGCTTCCCG	ACGGACAGGT	CATCACCATC	GGTAACGAGA	
<i>V. pullastra</i>		GAAGAGCTAC	GAGCTTCCCG	ACGGTCAGGT	CATCACCATC	GGTAACGAGA	
<i>R. decussatus</i>		GAAGAGCTAC	GAAGTTCCCG	ATGGACAGGT	CATCACCATC	GGTAACGAGA	
<i>P. magellanicus</i>		GAAGAGCTAC	GAGCTTCCCG	ACGGTCAGGT	CATCACCATC	GGAAACGAGC	
	201					cebador act-6 (inv)	250
<i>R. philippinarum</i>		GATTCCGTTG	CCCAGAATCC	CTTTTCCAGC	CATCCTTCTT	GGGTATGGAA	
<i>V. rhomboides</i>		GATTCCGTTG	CCCAGAATCC	CTTTTCCAGC	CATCCTTCTT	GGGTATGGAA	
<i>V. pullastra</i>		GATTCCGTTG	CCCAGAATCA	CTTTTCCAAC	CATCCTTCTT	GGGTATGGAA	
<i>R. decussatus</i>		GATTCCGTTG	CCCAGAATCC	CTTTTCCAGC	CATCCTTCTT	GGGTATGGAA	
<i>P. magellanicus</i>		GTTTCAGGTG	TCCCGAATCC	CTCTTCCAGC	CATCCTTCTT	GGGTATGGAA	

Figura 54. (continuación)

	251				Mae III300
<i>R. philippinarum</i>	TCTGCTGGTA	TCCATGAAAC	CACATACAAC	AGCATCATGA	AGT GTG ACGT
<i>V. rhomboides</i>	TCTGCTGGTA	TCCATGAAAC	CACATACAAC	AGCATCATGA	AGT GTG ACGT
<i>V. pullastra</i>	TCTGCTGGTA	TCCACGAAAC	CACATACAAC	AGCATCATGA	AGTGCGACGT
<i>R. decussatus</i>	TCTGCTGGTA	TCCATGAAAC	CACATACAAC	AGCATCATGA	AGTGCGACGT
<i>P. magellanicus</i>	TCTGCCGGTA	TCCACGAGAC	CACATACAAC	TCCATCATGA	AGTGCGACGT

	301		Rsa I		Rsa I350
<i>R. philippinarum</i>	CGACATCCGT	AAGGATCTCT	ACGCCAACAC	CGTCTTGTCT	GGTGGCACCA
<i>V. rhomboides</i>	CGACATCCGT	AAGGATCTCT	ACGCCAACAC	CGTCTTGTCT	GGTGGCACCA
<i>V. pullastra</i>	TGACATCCGT	AAGGATCTCT	ACGCCAACAC	CGTCTTGTCC	GGTGGCACCA
<i>R. decussatus</i>	CGACATCCGT	AAGGATCT GT	AC GCCAACAC	CGTCTTGTCT	GGT GT TACCA
<i>P. magellanicus</i>	CGACATCCGT	AAGGATCTGT	ACGCCAACAC	TGTCCTGTCC	GGAGGCACCA

	351				400
<i>R. philippinarum</i>	CCATGTTCCC	AGGTATTGCC	GACAGAATGC	AGAAGGAAAT	TACCGCCCTT
<i>V. rhomboides</i>	CCATGTTCCC	AGGTATTGCC	GACAGAATGC	AGAAGGAAAT	TACCGCCCTT
<i>V. pullastra</i>	CCATGTTCCC	AGGTATTGCC	GACAGAATGC	AGAAGGAAAT	TACCGCCCTT
<i>R. decussatus</i>	CCATGTTCCC	AGGTATTGCC	GACAGAATGC	AGAAGGAAAT	TACCGCCCTT
<i>P. magellanicus</i>	CCATGTTCCC	AGGTATTGCC	GATCGTATGC	AGAAGGAAAT	CACCGCCCTT

	401				450
<i>R. philippinarum</i>	GCTCCATCAA	CCATGAAGAT	CAAAATCATT	GCTCCACCAG	AGAGGAAATA
<i>V. rhomboides</i>	GCTCCATCAA	CCATGAAGAT	CAAAATTATT	GCTCCACCAG	AGAGGAAATA
<i>V. pullastra</i>	GCTCCATCTA	CCATGAAGAT	CAAAATTATT	GCTC~~~~~	~~~~~
<i>R. decussatus</i>	GCTCCATCAA	CCATGAaAT	CAAAATTATT	GCTCCACCAG	AGAGGAAATA
<i>P. magellanicus</i>	GCTCCCAGCA	CAATGAAGAT	CAAGATcATT	GCTCCACCAG	AGAGGAAATA

	451				500
<i>R. philippinarum</i>	CTCCGTCTGG	ATCGGTGGCT	CCATCCTTGC	TTCCCTCTCC	ACCTTCCA AC
<i>V. rhomboides</i>	CTCCGTCTGG	ATCGGTGGCT	CCATCCTTGC	TTCCCTCTCC	ACCTTCCA AC
<i>V. pullastra</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>R. decussatus</i>	CTCCGTCTGG	TTCGGTGGCT	CCTNCCTTGC	TTACCTGGCC	ACCT~~~~~
<i>P. magellanicus</i>	CTCCGTCTGG	ATCGGTGGCT	CCATCTTGGC	TTCTCTGTCC	ACCTTCCA AC

	501	cebador act-4 (inv)			550
<i>R. philippinarum</i>	AGATGTGGAT	CACCAAGCAG	A ~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>V. rhomboides</i>	AGATGTGGAT	CACCAAGCAG	A ~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>V. pullastra</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>R. decussatus</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>P. magellanicus</i>	AGATGTGGAT	CACCAAGCAG	GAATACGATG	AGTCCGCCCC	ATCCATTGTC

Además, las secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR de las especies de almejas, se compararon con las secuencias del ADNc del gen que codifica la actina muscular en el hombre (M20543), ratón (M12866), pollo (K02259), carpa (D50028), y carpín (D50029), obtenidas de la base de datos GenBank/EMBL. Se comprobó que las secuencias de los productos de PCR obtenidos a partir de las especies de almejas eran similares a las secuencias de ADNc. Por lo tanto, las secuencias del gen α -actina obtenidas a partir de los productos de PCR de almejas perdían los tres intrones presentes en este gen en posiciones conservadas en el hombre, ratón, rata y pollo (Taylor y col., 1988; Zakut y col., 1982; Fornwald y col., 1982; Hu y col., 1986).

En la región secuenciada (474 nucleótidos, excluyendo los cebadores) la homología entre las almejas fina y babosa fue del 96,3% (16 nucleótidos distintos), entre las almejas fina e italiana fue de 96,75% (14 nucleótidos distintos), y entre las almejas fina y rubia del 97,16% (13 nucleótidos diferentes). La homología de la secuencia de ADNc de *Placopecten magellanicus* (U55046) con respecto a las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia fue de 87,9%, 87,4%, 88,2% y 88,6%, respectivamente.

IV.1.4.1.2. Selección de endonucleasas y análisis de restricción

Mediante el programa MAP (GCG) se realizaron los mapas de restricción de las secuencias de los fragmentos amplificados de almeja babosa (*Figura 55*), fina (*Figura 56*), italiana (*Figura 57*) y rubia (*Figura 58*), obtenidas en este trabajo, y se compararon entre sí con el fin de encontrar endonucleasas que permitieran la identificación del origen específico de las muestras. Teniendo en cuenta la disponibilidad comercial de las enzimas, se eligieron las endonucleasas de restricción *Rsa* I y *Mae* III (Roche) (*Figura 54*).

La *Figura 59* muestra los resultados obtenidos tras la digestión de los productos de PCR de almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*) con las enzimas seleccionadas. La presencia de dos dianas de restricción de la enzima *Rsa* I en los productos de PCR de la almeja fina, dio lugar a tres fragmentos de 320 pb, 175 pb y 26 pb. Sin embargo, las almejas babosa, italiana y rubia no presentaron ningún punto de corte para esta enzima.

Figura 55. Mapa de restricción de la secuencia de un fragmento del gen α -actina de la almeja babosa (*V. pullastra*). El sitio de unión del cebador act-2 se muestra en verde y los puntos de corte de la enzima de restricción *Mae* III (5'-↓GTNAC-3') aparecen sombreados en naranja.



Figura 55. (continuación)



Figura 56. (continuación)

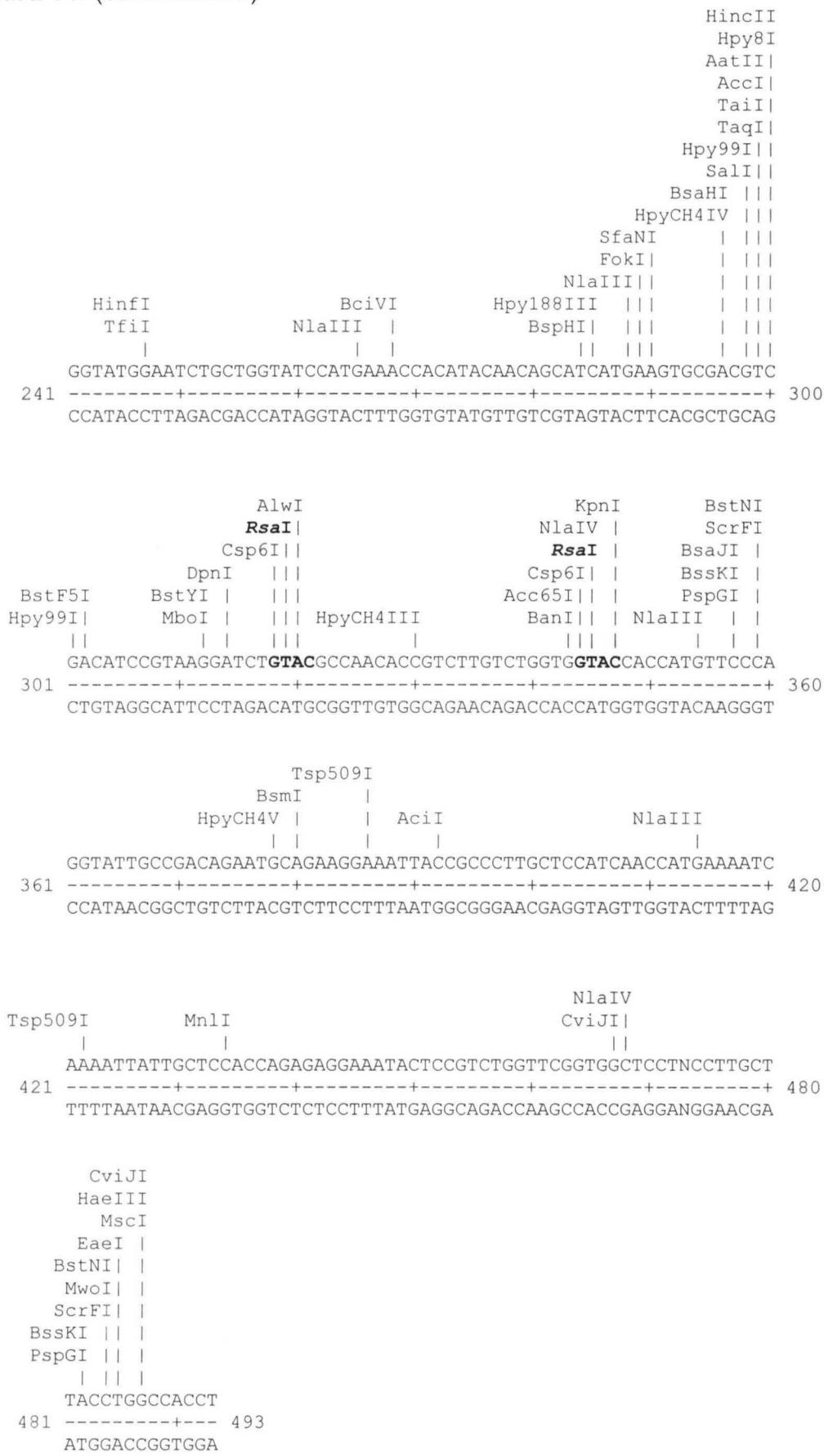


Figura 57. Mapa de restricción de la secuencia de un fragmento del gen α -actina de la almeja italiana (*R. philippinarum*). Los sitios de unión de los oligonucleótidos act-2 y act-4 se muestran en verde y los puntos de corte de la enzima de restricción Mae III (5'-↓GTNAC-3') aparecen sombreados en naranja.

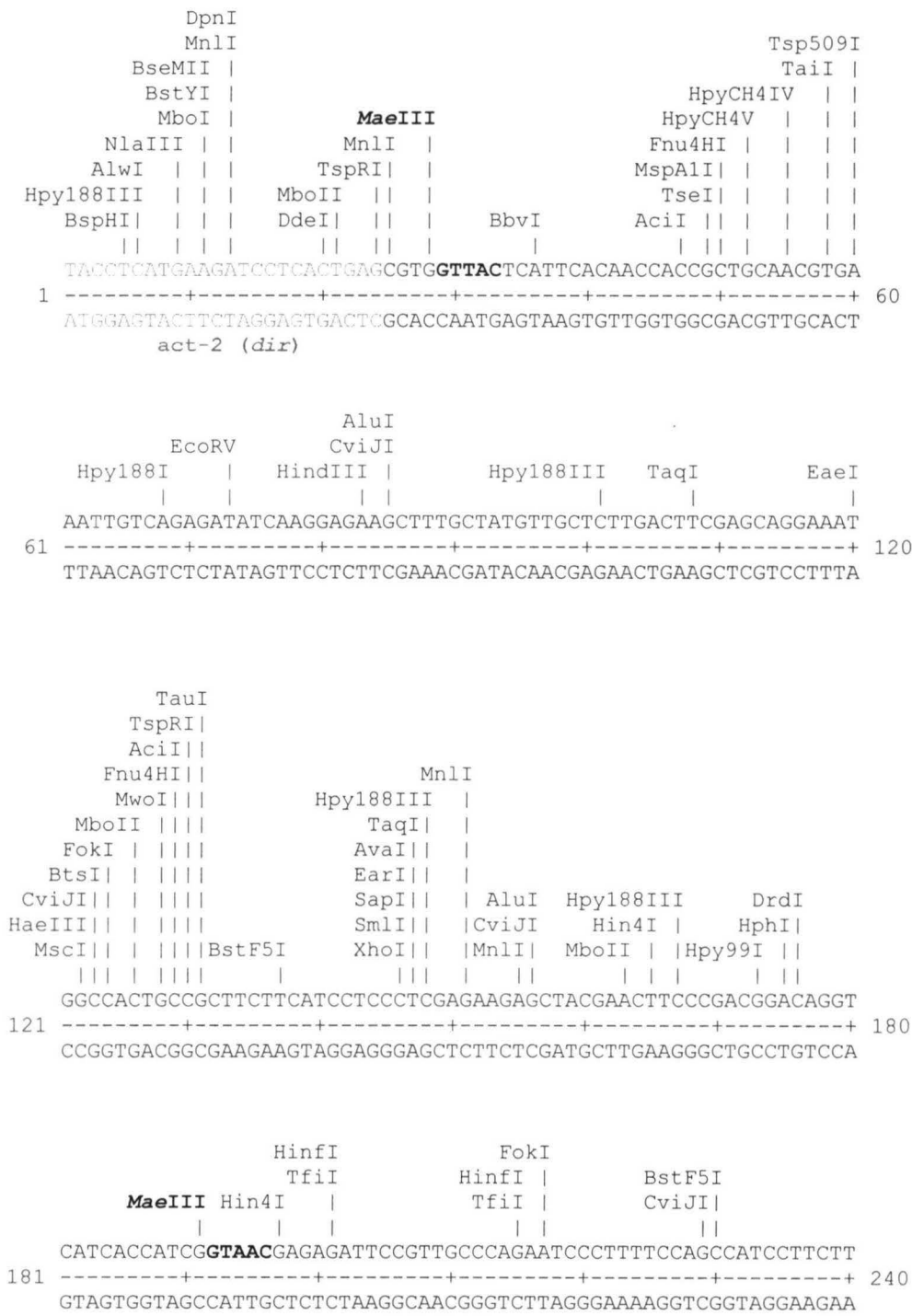
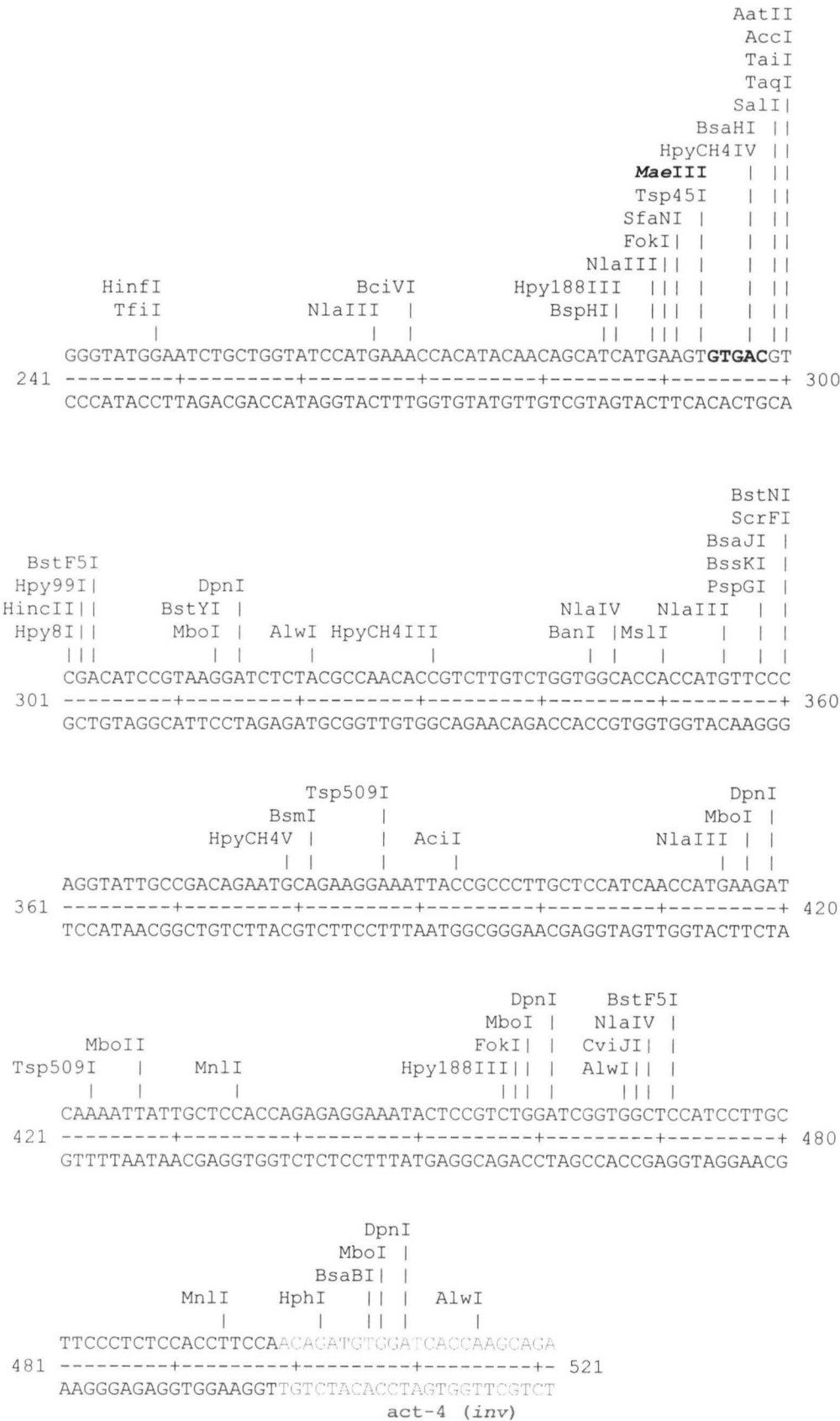


Figura 57. (continuación)



Figura 58. (continuación)



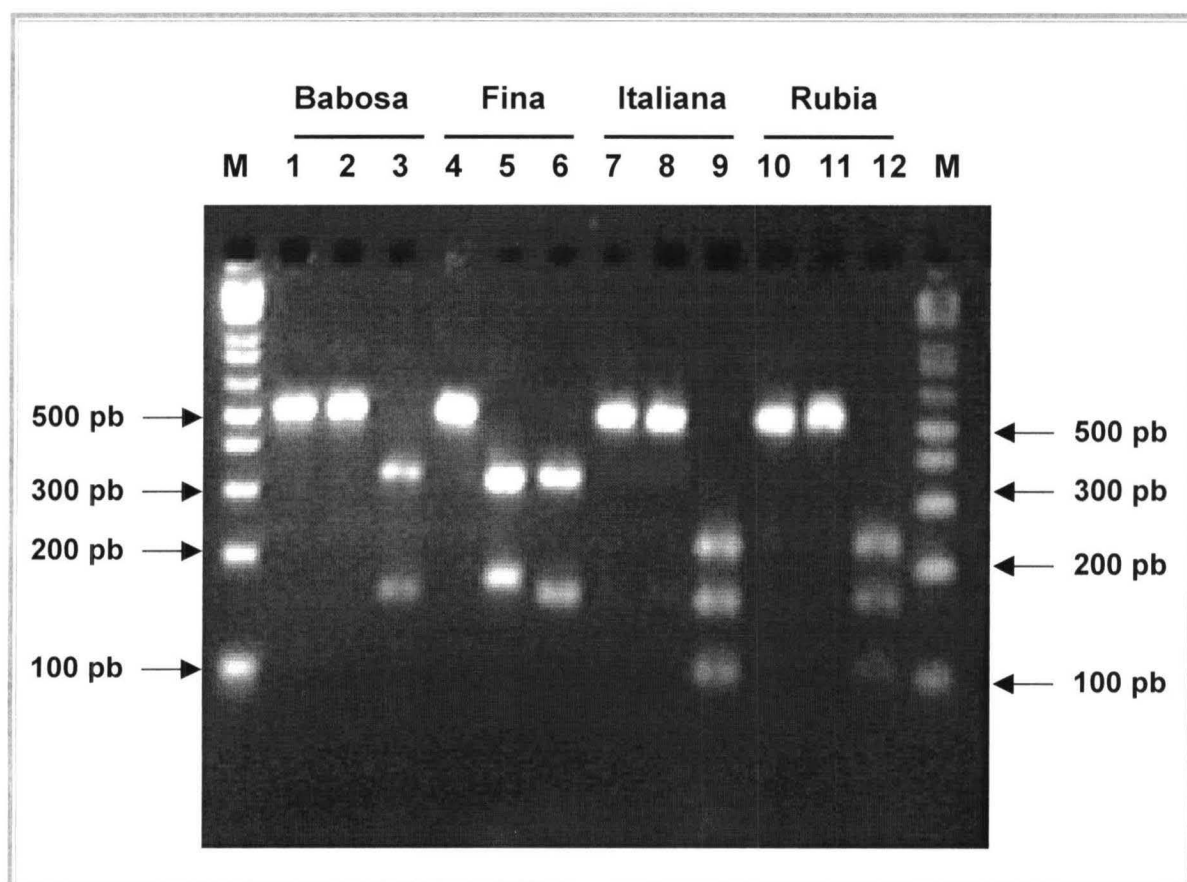


Figura 59. Análisis electroforético de los productos de PCR de 521 pb del gen α -actina amplificados con los cebadores act-2 y act-4 a partir de almeja babosa (1-3), fina (4-6), italiana (7-9) y rubia (10-12), tras la digestión con las enzimas *Rsa* I y *Mae* III. Muestras sin digerir (1, 4, 7, 10) y digeridas con las endonucleasas *Rsa* I (2, 5, 8, 11) y *Mae* III (3, 6, 9, 12). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

La presencia de dos dianas de restricción de la endonucleasa *Mae* III en los productos de PCR de las almejas fina y babosa, dio lugar a tres fragmentos de 330 pb, 162 pb y 29 pb en estas especies. Los productos de PCR de almeja italiana y rubia presentaron un punto de restricción adicional para la enzima *Mae* III, dando lugar en ambas especies a cuatro fragmentos de 228 pb, 163 pb, 102 pb y 28 pb. Conviene destacar, que la resolución del gel no permite la visualización de los fragmentos menores de 30 pb resultantes de la digestión.

La gran homología existente entre las secuencias del fragmento amplificado del gen α -actina en las especies de almejas italiana y rubia (98,84%), no permitió identificar enzimas de restricción que pudieran diferenciar estas dos especies de almejas entre sí.

Se examinaron 15 individuos de cada una de las cuatro especies para comprobar la ausencia de variaciones intraespecíficas en los perfiles de restricción con las enzimas *Rsa* I y *Mae* III, y no se encontró polimorfismo intraespecífico.

IV.1.4.1.3. Análisis del polimorfismo en la longitud de las cadenas sencillas de ADN (PCR-SSCP)

Utilizando los cebadores act-5 y act-6 (*Figura 54*) y las condiciones de la reacción de PCR descritas en la sección III.2.6.1.2., se amplificó un fragmento de 150 pb en las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia (*Figura 60*). Posteriormente, se purificaron los productos de PCR obtenidos según el protocolo descrito en la sección III.2.8.1.

A continuación, se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa la concentración de ADN de los productos de PCR purificados, empleando para ello el sistema de documentación de geles Gel Doc 1.000 System-PC (Bio-Rad) y el patrón *Mass Ruler* (Bio-Rad). Las concentraciones de ADN se ajustaron a 7 ng/ μ L, y el ADN bicatenario se desnaturalizó a ADN monocatenario siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.11.1.

Finalmente, los ADNs desnaturalizados se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando el sistema electroforético Phastsystem™ (sección III.2.11.2.). Los perfiles de bandas de ADN obtenidos tras la electroforesis de las muestras se muestran en la *Figura 61*.

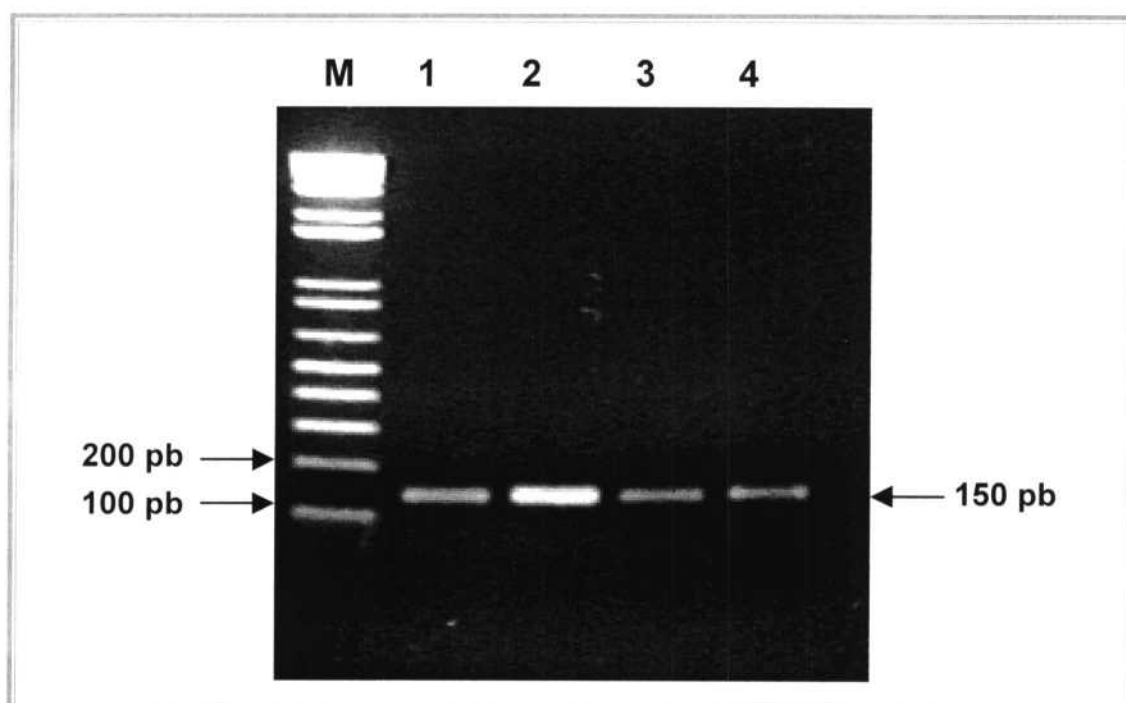


Figura 60. Electroforesis en agarosa del producto de PCR purificado de 150 pb del gen α -actina amplificado con los oligonucleótidos act-5 y act-6, obtenidos a partir de las especies de almeja babosa (1), fina (2), italiana (3) y rubia (4). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

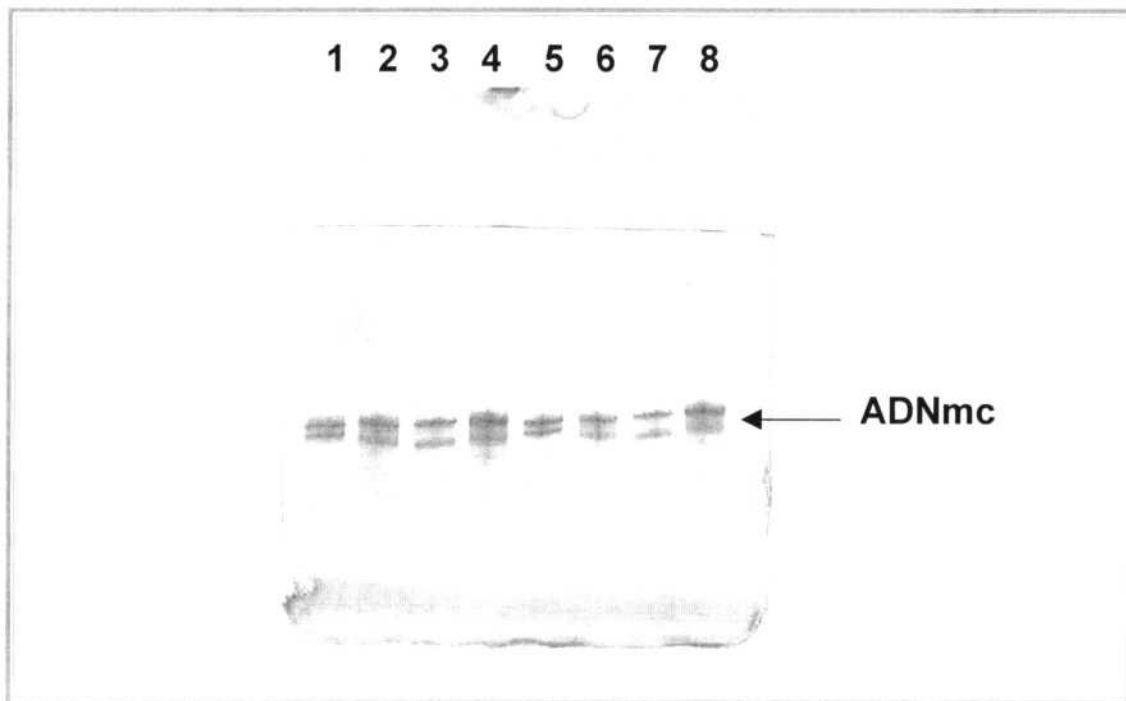


Figura 61. Perfiles de bandas de ADNmc obtenidos mediante la técnica de PCR-SSCP en PhastSystem™ a partir de productos de PCR del gen α -actina, amplificados con los cebadores act-5 y act-6. Muestras de dos individuos de cada especie: almeja babosa (1, 5), fina (2, 6), italiana (3, 7) y rubia (4, 8). (ADNmc) ADN monocatenario.

IV.1.4.2. ESPACIADOR INTERNO DE LA TRANSCRIPCIÓN (ITS)

IV.1.4.2.1. Amplificación por PCR y secuenciación

Los cebadores ITS-1 e ITS-2 permitieron la amplificación de las regiones del ADNr ITS-1 e ITS-2 (espaciadores internos de la transcripción) y de la región conservada 5,8S (*Figura 28*). Empleando esta pareja de cebadores según las condiciones descritas en la sección III.2.6.2., se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.100 pb en las especies de almeja babosa, fina e italiana, cuya longitud exacta se determinó tras la secuenciación. En la almeja rubia, con los cebadores ITS-1 e ITS-2 se amplificaron dos fragmentos de ADN de 1.000 pb y 1.200 pb (*Figura 62*).

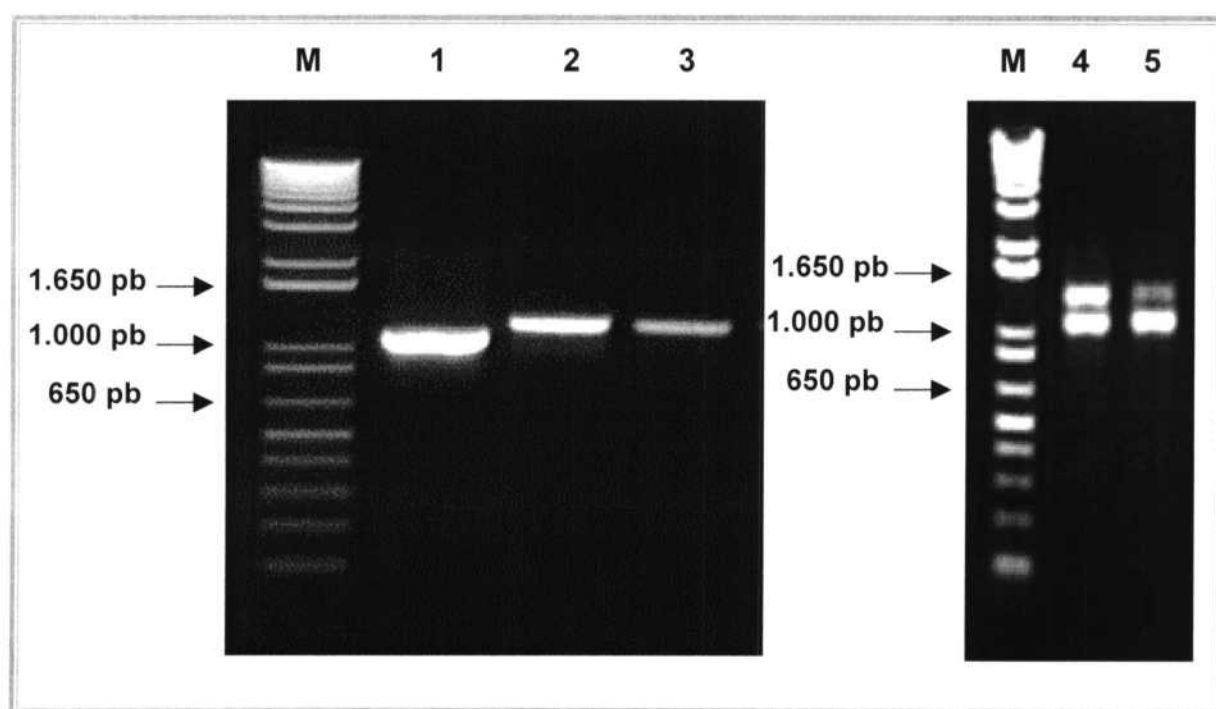


Figura 62. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS-1 e ITS-2. Muestras: almeja babosa (1), almeja fina (2), almeja italiana (3) y rubia (4, 5). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

La intensidad de amplificación de las dos bandas presentes en los productos de PCR de la almeja rubia, fue variable en los distintos individuos. En algunos casos se amplificó con mayor intensidad una de las dos bandas y en otros sólo se amplificó una de ellas, por lo que este marcador genético no se pudo utilizar para analizar los perfiles de restricción de dicha especie mediante PCR-RFLP.

Los productos de PCR obtenidos a partir de un individuo de las almejas babosa, fina e italiana se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy según el protocolo descrito en la sección III.2.8.2., y se secuenciaron con los cebadores del vector M13F y M13R, así como con los cebadores ITS-3 e ITS-4 (sección III.2.8.3.). La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. De cada muestra secuenciada se obtuvieron cuatro secuencias parciales, utilizando los cebadores M13F, M13R, ITS-3 e ITS-4. Las secuencias parciales obtenidas utilizando los cebadores M13F y M13R contenían las secuencias de los cebadores ITS1 o ITS2, dependiendo de la orientación con que se hubiera insertado el producto de PCR en el vector. La secuencia parcial que contenía el cebador ITS-1 (directo) se completó con la obtenida al secuenciar con el cebador ITS-4 (directo). De forma similar, la secuencia parcial que contenía el cebador ITS-2 (inverso) se completó con la obtenida al secuenciar el producto de PCR en la misma dirección con el cebador ITS-3. Una vez obtenidas las secuencias completas de las dos hebras del producto de PCR, se obtuvo la inversa y complementaria de una de ellas para comprobar la ausencia de errores en la secuenciación y obtener la secuencia final del producto de PCR en cada especie de almejas.

Tras el análisis de las secuencias, se verificó que la longitud del fragmento de PCR fue de 1.075 pb en la almeja babosa (*V. pullastra*), 1.195 pb en la almeja fina (*R. decussatus*) y 1.188 pb en la almeja italiana (*R. philippinarum*). Una vez completadas, las secuencias de almeja babosa, fina e italiana se alinearon manualmente utilizando el programa LINEUP del paquete informático GCG (Figura 63).

Figura 63. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ITS-1/ITS-2, a partir de muestras de almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*) e italiana (*R. philippinarum*). La secuencia de la región del ADNr 5,8S está alineada con las secuencias de dicha región en humano y erizo de mar obtenidas de la base de datos EMBL (J01866 y LVRRNA01, respectivamente). Los cebadores ITS-1 (directo) e ITS-2 (inverso) se indican en verde, y los oligonucleótidos ITS-4 (directo) e ITS-3 (inverso) empleados para la secuenciación se indican en azul. Las dianas de restricción de la enzimas *Rsa* I (5'-GT↓AC-3') y *Hinf* I (5'-G↓ANTC-3') se muestran sombreadas en morado y naranja, respectivamente. La región conservada del 5,8S se encuentra sombreada en azul claro. (N) base no identificada.

	1	ITS-1 (dir)				50
<i>V. pullastra</i>	GGTTTCGGTAG	GTGAACTTGC	GGATGGATCA	TTAC.....	
<i>R. decussatus</i>	GGTTTCGGTAG	GTGAACTTGC	GGATGGATCA	TTACAAAAAC	ACGCACGCAC	
<i>R. philippinarum</i>	GGTTTCGGTAG	GTGAACTTGC	GGATGGATCA	TTNC.....	
	51					100
<i>V. pullastra</i>	
<i>R. decussatus</i>	GAGAGAGGTG	TGCATTGATC	GATGAGATCA	TGACCAAAAA	AAAACCGCAC	
<i>R. philippinarum</i>	
	101					150
<i>V. pullastra</i>	
<i>R. decussatus</i>	AAAAGTTGCT	TTTTTGAACG	CCAATTCGAA	CGCGGAAGCA	CACGGCGACG	
<i>R. philippinarum</i>	
	151					Rsa 1200
<i>V. pullastra</i>C	AGGAATTGTG	CCGTGTGTGT	CTTGAAATAC	CAGGCGTACT	
<i>R. decussatus</i>	TGTGCTTAAT	AAACATCGAT	GCTTATGGGG	TGCACTGCAG	AACGGGACGG	
<i>R. philippinarum</i>CN	TGAANTGATN	GACTTCCGGC	AGATCCNGCC	TTGCCCAGTN	
	201					250
<i>V. pullastra</i>	ATTCAATGCC	GTAAAGCAC	ACGGGGACGT	GTGCAGAATA	AACATCCGGC	
<i>R. decussatus</i>	CGCCGGCGGA	GAAAGTCGGG	GACGGCCCGG	TTTCGTCCGC	AGTGGTGTTA	
<i>R. philippinarum</i>	TNTAAACTAA	TCTTGAACGC	ACCANGNACG	CCCAGTTGAC	GCGTGCCTAN	
	251					Hinf 1 300
<i>V. pullastra</i>	CGCCTATATC	GTCCACAGTG	GTGTTACACG	CCCCG GACTC	GGCTGGTCTT	
<i>R. decussatus</i>	CATCACCTTG	GGCGAGACGC	ACACGTCTCT	GCGGGGA.GC	GATCGATGCA	
<i>R. philippinarum</i>	TAAAACGTTG	ACCCAGCAGC	ACCCGGTTTA	CGGGNTGCCC	CGGCGGCGGA	
	301	Rsa 1				350
<i>V. pullastra</i>	GCACGCCAAA	GCACACGGGG	ACGTGTGCGA	AATAAACATC	CGACTTTGCA	
<i>R. decussatus</i>	GCGGCGCCAC	GTAC GTGGCC	TCGCCGAGGA	CGCTCCCTTC	GAACGCGGAA	
<i>R. philippinarum</i>	TTGGCCACCG	CTGCCGGACT	GCGGCCACCA	CTTCGGGCTG	CTGCTGGAAA	

Figura 63. (continuación)

	351	Hinf I				400
<i>V. pullastra</i>	CGCTAACGCC	AGCCCCGGGA	CGCCCGGAGC	CCGGGGACGC	CCGGGCTTGG	
<i>R. decussatus</i>	GCACACGGCG	ACGTGTGCCT	AATAAACATC	GATGCTTATG	GGGTGCTCGG	
<i>R. philippinarum</i>	AAGTCGGGAG	CCGTCCGCCA	GAGGT GATTC	CCACCCAGGA	CAGTGGCTCT	
	401	Hinf I				450
<i>V. pullastra</i>	CGAACTTTGC	ACGCTAAAGC	ACACGGCGAC	GTGTGCCTAA	TAAACATCGG	
<i>R. decussatus</i>	TTGGTCCTCT	CGGCCGATGC	CCGACCGGAC	CGGCTGGGGC	TCTCGGTGCT	
<i>R. philippinarum</i>	CGCAGCGCCG	TGGGGTGCCG	GCGGTCGAGG	ACCCTC GAAT	CGCTCCCTTT	
	451					500
<i>V. pullastra</i>	TATGGGGTGC	CCGGGGACGT	CCCGGGCGGC	AAGGCGATCT	TCCAGTTGT	
<i>R. decussatus</i>	AGCTACACGC	GGGGCTCCGA	TCCGAGCGGC	AAGGCGATCT	TCCCCGTGCC	
<i>R. philippinarum</i>	GGCCGGGGAG	CGAGGAACGG	TCCCGGACCT	AGTTCGCTTG	CCCATGCTGC	
	501					550
<i>V. pullastra</i>	GGGTCAAATC	CGCCCCGCGT	TCAATTTCTC	GCTCGCGAGA	AGCCGAACGC	
<i>R. decussatus</i>	GGG..AAATC	CGCCCCGCGT	TGCTTCTTTT	TTACACGAAGA	GAGGAGCGCG	
<i>R. philippinarum</i>	TCGCGAACGA	CGCCGGCCGC	AAGGCGATCT	TCCCCCTGCC	GGGAAAAGCG	
	551	Rsa I 600				
<i>V. pullastra</i>	CCCTTTGCAT	AACGCACACT	ACCGTCGTTC	TTTGCAGAGG	GCGCGGTGCT	
<i>R. decussatus</i>	CCCTTTGCAG	AACGCACACA	GTGATGTTTT	TGCGGAGA..GCACGG	
<i>R. philippinarum</i>	CCCTCTTTC	CCGTCTCTTC	GGAGACGGGA	TTGCGCCCTC	CTCAAAGCGT	
	601	Hinf I		Rsa I 650		
<i>V. pullastra</i>	CGGGGGGTGA	AACCCTTGGC	GCCGCCTTTG	CACGCTTAAG	ACCCTCGTAT	
<i>R. decussatus</i>	CGGAGAGGCG	AGAGTCTCTC	CCCGACTTTG	CACGCTTAAG	ACCCT.GTAT	
<i>R. philippinarum</i>	ACACCAACGT	TTTTGCGGGC	GTGCGGGAGG	AAAACAACCT	ACTAGTTAGT	
	651	Hinf I				700
<i>V. pullastra</i>	CCGAGCTCTC	GGGAGACAGG	GCGCAGGACT	TCTGCCCCTG	TTGCGCGGGC	
<i>R. decussatus</i>	CCGGGCTCTC	GGGAGACGGG	TGCAGGACT	TCTGCCCCTG	TTGCGCGGGC	
<i>R. philippinarum</i>	AC...TCCGC	GCTTGAACGC	GTGACTCTGT	.ATCCGGGCT	CTCTCGGGAG	
	701					750
<i>V. pullastra</i>	GGTAGACACC	TGTTC.....	
<i>R. decussatus</i>	GGTAGACACC	TGTTC.....	
<i>R. philippinarum</i>	ACAGAGCGCA	GGACTTCCGC	CCGTGTTGCG	CGGGCGGTGC	ACACCTGTTC	
	751	5,8S				800
<i>V. pullastra</i>	..AAATCTGA	GACAACTCTA	TGCGGTGGAT	CACTCGGCTC	GTGCGTCGAT	
<i>R. decussatus</i>	..AAATCTGA	GACAACTCTA	TGCGGTGGAT	CACTCGGCTC	GTGCGTCGAT	
<i>R. philippinarum</i>	AGAAATCTGA	GACAACTCTA	TGCGGTGGAT	CACTCGGCTC	GTGCGTCGAT	
J01866		CGACTCTT	AGCGGTGGAT	CACTCGGCTC	GTGCGTCGAT	
LVRRA01		AATTCTT	GGCGGTGGAT	CACTCGGCTC	GTGCGTCGAT	
	801	5,8S				850
<i>V. pullastra</i>	GAAGAGCGCA	..GCCAGCTGCG	TGAATTAATG	TGAATTGCAG	GACACACTGA	
<i>R. decussatus</i>	GAAGAGCGCA	..GCCAGCTGCG	TGAATTAATG	TGAATTGCAG	GACACACTGA	
<i>R. philippinarum</i>	GAAGAGCGCA	..GCCAGCTGCG	TGAATTAATG	TGAATTGCAG	GACACACTGA	
J01866	GAAGAACGCA	GCGCTAGCTGCG	AGAATTAATG	TGAATTGCAG	GACACATTGA	
LVRRA01	GAAGAACGCA	GCCAGCTGCG	AGAATTAATG	TGAATTGCAG	AACTCCTTGA	

Figura 63. (continuación)

	851	5,8S				900
<i>V. pullastra</i>	ACATCGACAC	CTTGAACGCA	CATTGCGGCT	CTGGC..TCACT	GCCAGAGCCA	
<i>R. decussatus</i>	ACATCGACAC	CTTGAACGCA	CATTGCGGCT	CTGGC..TCACT	GCCAGAGCCA	
<i>R. philippinarum</i>	ACATCGACAC	CTTGAACGCA	CATTGCGGCT	CTGGC..TCACT	GCCAGAGCCA	
J01866	TCATCGACAC	TTCGAACGCA	C..TTGCGGCC	CCGGG..TTCCT	CCCGGGGCTA	
LVRRNA01	TCATCGACAT	TTCGAACGCA	CATGGCGGCC	CGGGCCTTCGCG	GCCCGAGCCA	
	901	ITS-3 (dir)/ITS-4 (inv)				950
<i>V. pullastra</i>	CGCCTGTCCG	AGGGTCGGCG	AACACACAAT	CGCACAGCCG	TCT....TG	
<i>R. decussatus</i>	CGCCTGTCCG	AGGGTCGGCG	AACAAATAAT	CGCAAAGCGA	TATCCATGTG	
<i>R. philippinarum</i>	CGCCTGTCCG	AGGGTCGGCG	AACAAGTCAT	CGGCTCTCAC	TGTTCA..TT	
J01866	CGCCTGTCTG	AGCGTCGCTT				
LVRRNA01	CGCCCGTCCG	AGGGTCGGT				
	951	Hinf I				1000
<i>V. pullastra</i>	CACGGTGTGT	GCGCGTTGGC	GAGTC GCGCG	GGCTTCAGTC	CCGGTCGTCC	
<i>R. decussatus</i>	CATATTGCTT	GCGCGTTGGC	GTGTCGCTCG	GGC.TCAGAC	CCGATCGTCC	
<i>R. philippinarum</i>	ACAGTGAGGG	GCGAGTTGGC	GCGTCGCGCG	GGCTTTCGTC	CCGCTCGTCC	
	1001	Hinf I				1050
<i>V. pullastra</i>	GCCGAAGACT	TCAGCCTCTC	TCTGGGCGGC	CTTACA....	...GAGGTGG	
<i>R. decussatus</i>	GCCGAAGACT	TCAGCCTCTC	TCTGGGCGGC	C.GACC....	...GAGGTGG	
<i>R. philippinarum</i>	GCCGTAGATT	CCAGCCTCTC	TCTGCCGGTC	GAACCAGTCG	CTGGAAGTGG	
	1051	Rsa I 1100				
<i>V. pullastra</i>	CGCGGGGACA	GGGCTCGAAC	GGGCCTTC.T	GTCTGGCGCC	TC GTAC CCCC	
<i>R. decussatus</i>	CGCGGGGACA	GGGCTCGAAC	GGGCCTTC.T	GTCTGGCGCC	GCGTCCTCCC	
<i>R. philippinarum</i>	CGCGGAGACA	GGGCTCGAAC	GGGCCCCGAC	GTCCCGCTCC	GCGTCCTCCT	
	1101					1150
<i>V. pullastra</i>	TAGCCGGGGT	GCGGCCCTCC	GTGCGGCGGC	TCCATCGCCC	CTTCACCGG.	
<i>R. decussatus</i>	ACTAGCCTGG	GAGGGCGGCC	CTCTGCCGGC	TTCCGTCACC	CAGCCTCTGT	
<i>R. philippinarum</i>	TCACCGGAGG	GCGGCCTTCC	GTGCGGCGTC	GTCGCCGGCA	AAAGCGAGAG	
	1151					1200
<i>V. pullastra</i>	.GGAGAGAGA	GCGGCGGTCA	CACGCCGACA	AAGAGACCGT	CTCGTCGTCC	
<i>R. decussatus</i>	AGCGGAGGAG	GGGGGAGCGA	GCGGCGGTGA	AACGCCGAAG	CCAGTAGCGC	
<i>R. philippinarum</i>	AGAGCGGCGA	AGGACGGGTC	TAGCCAGCCC	GGCCCCGAGC	CGAAACCGGA	
	1201	Hinf I				1250
<i>V. pullastra</i>	ATCGCGATGA	CGATGATGGT	CTCGTCACAC	AT.....	
<i>R. decussatus</i>	TGCACTGTGC	TGCAGTGCAG	CCGCTCACCT	AT.....	
<i>R. philippinarum</i>	GACGCGGGGA	GACAGGCCGA	CTGACGACGA	CGACTC CAGC	GATGGGGTGC	
	1251	Hinf I				1300
<i>V. pullastra</i>CC	
<i>R. decussatus</i>CC	
<i>R. philippinarum</i>	GAGTCC GATG	ACGCCGCCTC	AACCCCGCAC	CACCTCCAAA	AAATTTCATCC	
	1301	ITS-2 (inv)				1318
<i>V. pullastra</i>	GACCTCAGAT	CAGACGAG				
<i>R. decussatus</i>	GACCTCAGAT	CAGACGAG				
<i>R. philippinarum</i>	GACCTCAGAT	CAGACGAG				

El primer espaciador interno de la transcripción (ITS-1) tuvo una longitud de 600 pb en la almeja babosa, 715 pb en la almeja fina y 634 pb en la almeja italiana; mientras que la longitud del segundo espaciador interno de la transcripción (ITS-2), fue de 317 pb en la almeja babosa, 322 pb en la fina, y 396 pb en la italiana. La secuencia nucleotídica de la región conservada 5,8S del ADNr fue idéntica en las tres especies de almejas analizadas (158 pb) (*Figura 63*). Cuando se compararon las secuencias de la región 5,8S en las especies de almejas objeto de estudio y las secuencias de dicha región de humano (J01866), erizo de mar (LVRRNA01) y el molusco gastrópodo *Oncomelania hupensis* (U93222) obtenidas de la base de datos EMBL, los porcentajes de homología fueron de 84%, 84,6% y 85,18%, respectivamente.

IV.1.4.2.2. Selección de endonucleasas y análisis de restricción

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados en la almeja babosa, fina e italiana, se obtuvieron sus mapas de restricción para tratar de localizar puntos de corte específicos que permitieran identificar dichas especies. En la *Figura 64* se muestra el mapa de restricción de la almeja babosa, en la *Figura 65* el de la almeja fina y en la *Figura 66* el correspondiente a la almeja italiana.

Teniendo en cuenta la disponibilidad comercial de las enzimas y el análisis de los mapas de restricción de la almeja babosa, fina e italiana, se seleccionaron las endonucleasas *Rsa* I y *Hinf* I como las más apropiadas para la diferenciación de las tres especies de almejas citadas (*Figura 63*). En la *Figura 67*, se muestran los resultados del análisis de restricción de los productos de PCR de almeja babosa, fina e italiana. Los fragmentos resultantes de la digestión se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa MS-8 al 3% en tampón TAE.

La presencia de una diana de restricción de la enzima *Rsa* I en los productos de PCR de la almeja fina dio lugar a dos fragmentos de 884 pb y 311 pb. Sin embargo, en las muestras de almeja babosa e italiana esta enzima tiene dos puntos de corte, que cortan los productos de PCR en tres fragmentos de 847 pb, 156 pb y 72 pb en la almeja babosa, y de 662 pb, 476 pb y 50 pb en la almeja italiana.

Figura 64. Mapa de restricción correspondiente a los productos de PCR de almeja babosa (*V. pullastra*), obtenidos tras la amplificación con los cebadores ITS-1/ITS-2. Los sitios de unión de los oligonucleótidos ITS-1/ITS-2 e ITS/3-ITS-4 se muestran en verde y azul, respectivamente. La región del ADNr 5,8S se encuentra sombreada en azul claro y las dianas de las enzimas de restricción *Rsa* I (5'-GT↓AC-3') y *Hinf* I (5'-G↓ANTC-3') se muestran sombreadas en morado y naranja, respectivamente.

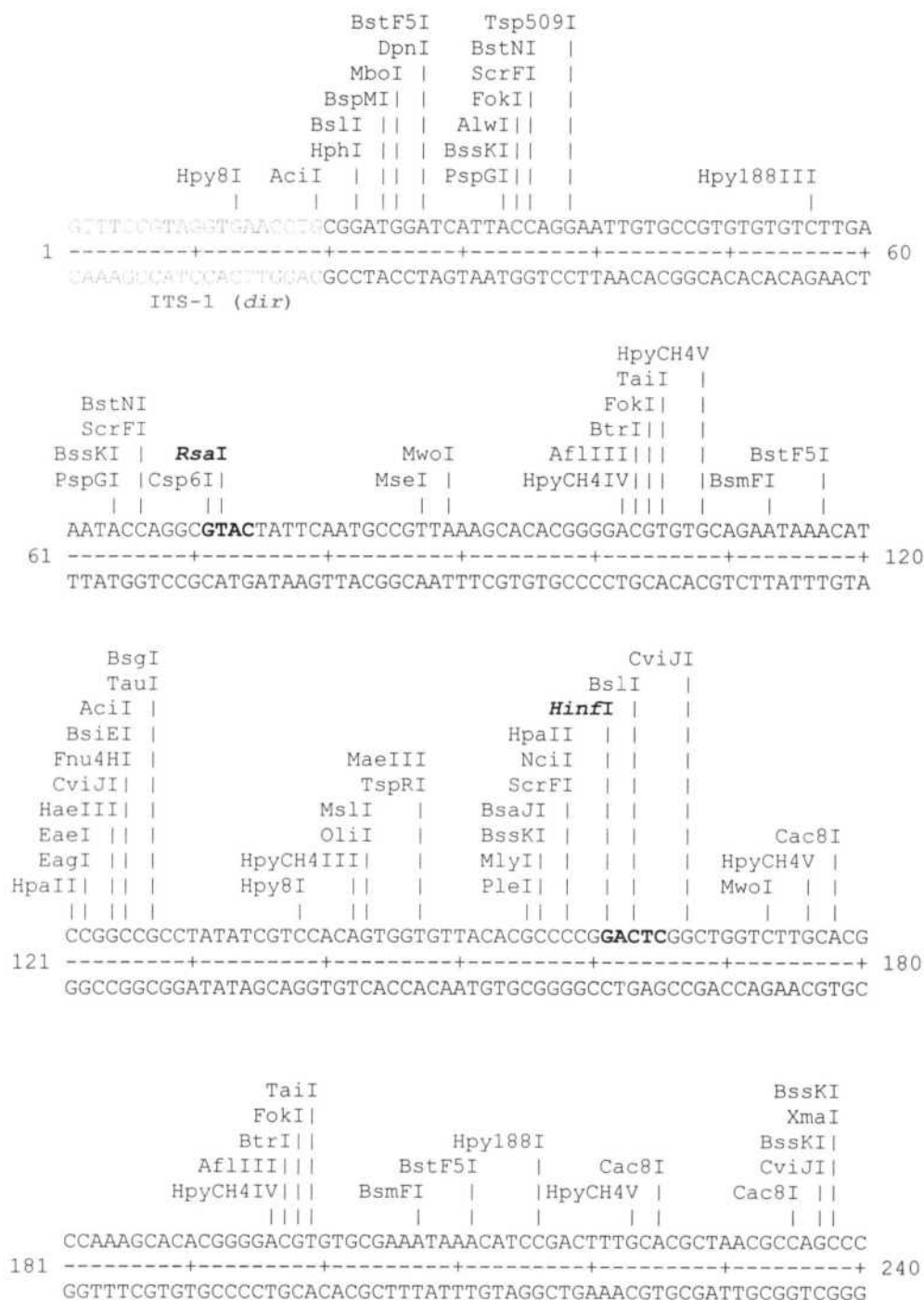


Figura 64. (continuación)

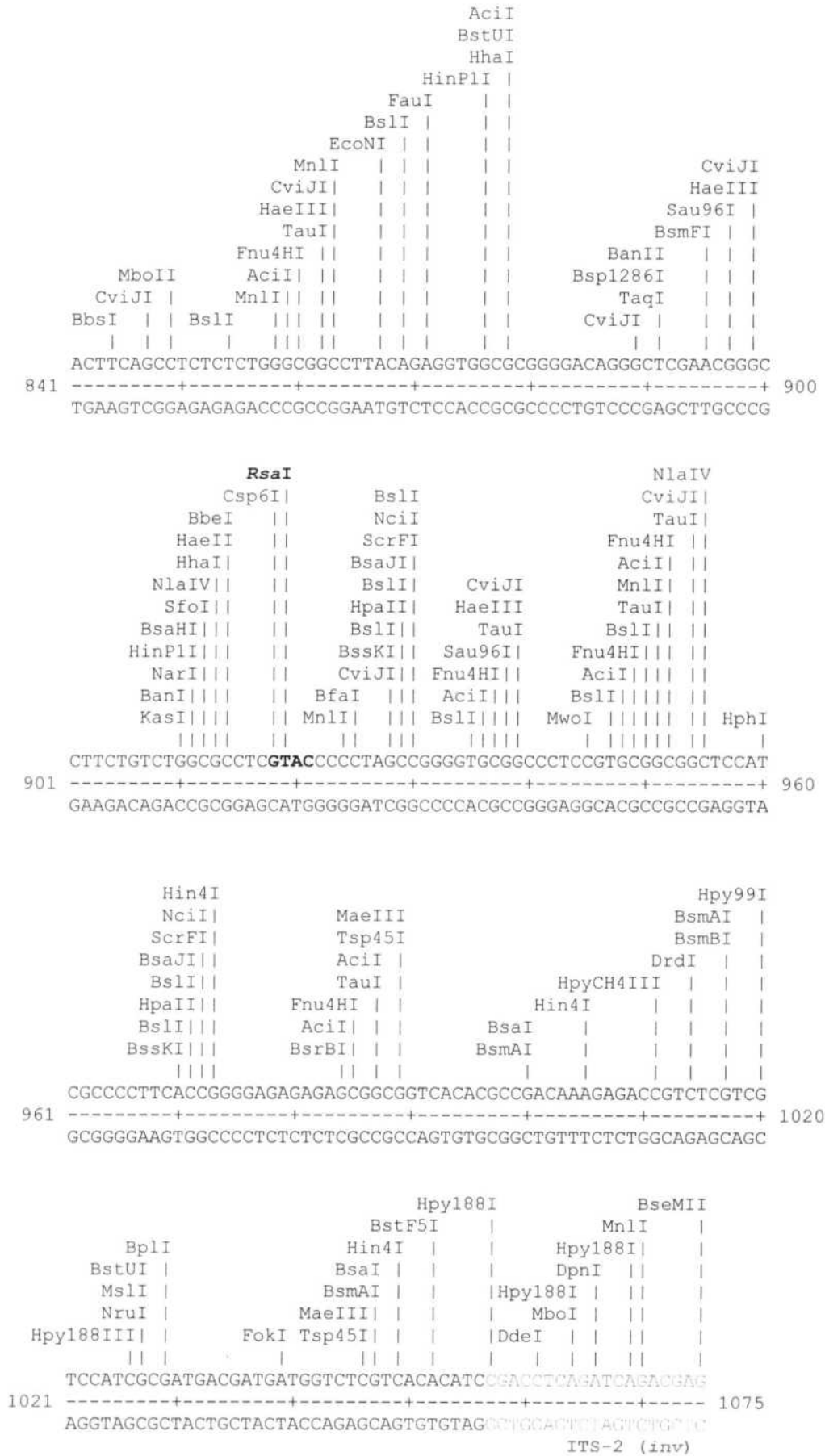


Figura 65. Mapa de restricción correspondiente a los productos de PCR de almeja fina (*R. decussatus*), obtenidos tras la amplificación con los cebadores ITS-1/ITS-2 e ITS-3/ITS-4 se muestran en verde y azul, respectivamente. La región del ADNr 5,8S se encuentra sombreada en azul claro y las dianas de las enzimas de restricción *Rsa* I (5'-GT↓AC-3') y *Hinf* I (5'-G↓ANTC-3') se muestran en morado y naranja, respectivamente.

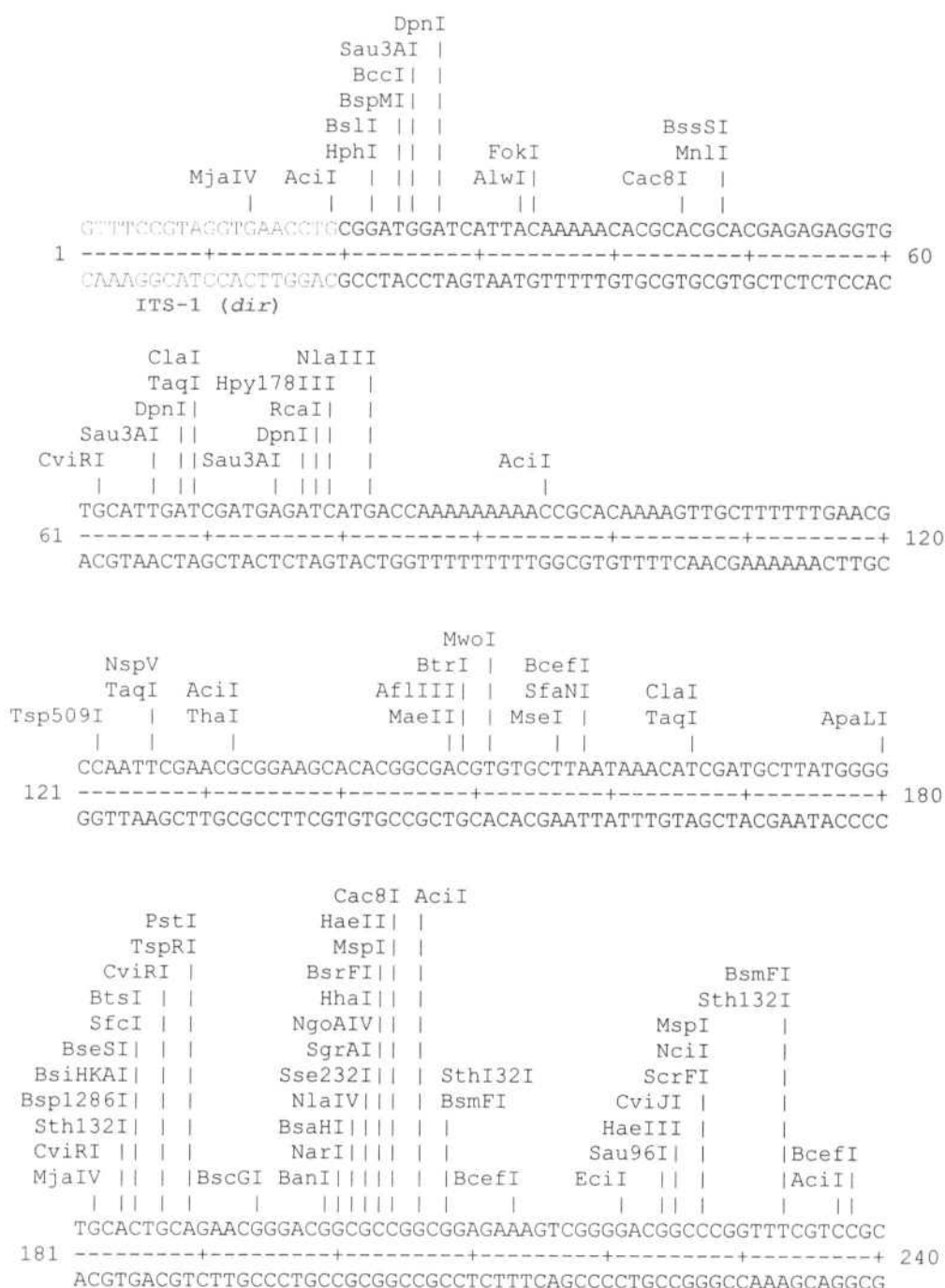


Figura 65. (continuación)

```

                                                    AciI
                                                    MspAI
                                                    Fnu4HI |
                                                    CviRI |
                                                    TseI |
                                                    MwoI ||
BsiEI | || |
ClaI | || |
PvuI | || |
TaqI | || |
DpnI | || |
                                                    Sau3AI || | ||
MaeIII  ScrFI      MaeII||  SfaNI  | || | ||
TspRI    BsaJI|      Sth132I|| AciI  | | || | ||
HphI|    BsaJI||      DrdI|||BsmAI| | | || | ||
BtsI  ||  EcoRII||      AflIII|||BsmBI| | | || | ||
|  ||      |||      ||||  ||  | | || | ||
AGTGGTGTTACATCACCTGGGCGAGACGCACACGTCTCTGCGGGGAGCGATCGATGCAG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TCACCACAATGTAGTGGGACCCGCTCTGCGTGTGCAGAGACGCCCTCGCTAGCTACGTC

```

```

BslI
BsaJI|
EcoNI||
MnlI  |||
CviJI| |||
HaeI  |||
HaeIII|||
BsaAI  || |||
BstXI  || |||
MaeII  || |||
MslI|| || |||
RsaI || || |||
BbvI  ||| || |||
BsaAI  ||| || |||
SunI  ||| || |||
MaeII  ||| || |||
HaeII  || ||| |||
HhaI  || ||| |||
NlaIV|| || ||| |||
BsaHI||| || ||| |||
NarI||| || ||| |||
BanI||| || ||| |||
Fnu4HI||| || ||| ||| |||MnlI  NspV
TauI||| || ||| ||| |||MwoI  TaqI  AciI  AflIII
||| || ||| ||| |||  ||  ||  ||  ||
CGGCGCCACGTACGTGGCCTCGCCGAGGACGCTCCCTTCGAACGCGGAAGCACACGGCGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GCCGCGGTGCATGCACCGGAGCGGCTCCTGCGAGGGAAGCTTGCGCCTTCGTGTGCCGCT

```

```

SfaNI
AvaII |
Sau96I |
MwoI  BcefI  ClaI      BsiHKA|  |
BtrI  |  SfaNI  TaqI      Bsp1286I  |  MnlI
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
CGTGTGCCTAATAAACATCGATGCTTATGGGGTGCTCGGTTGGTCCTCTCGGCGATGCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GCACACGGATTATTTGTAGCTACGAATACCCACGAGCCAACCAGGAGAGCCGCTACGGG

```

Figura 65. (continuación)

```

                                                    MboII
                                                    Fnu4HI |
                                                    TauI |
                                                    AciI |
                                                    BsrBI |
                                                    Hpy188IX ||
AluI                                                    DpnI | | |
CviJI                                                    Hpy188IX | | |
MspI |                                                    Sau3AI | | |
BsrFI | |                                                    BanII | | |
AvaII || |                                                    Bsp1286I | | |
RsrII || |                                                    NlaIV | | |
Sau96I || |                                                    CviJI | | |
Sth132I || |                                                    AlwI | | |
BsiEI | | | BanII | | | | | | | | | | | | | | | |
MspI | | | Bsp1286I | | | | | | | | | | | | | | | |
BsaWI | | | CviJI | MwoI | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CGACCGGACCGGCTGGGGCTCTGCGTGCTAGCTACACGCGGGGCTCCGATCCGAGCGGCA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GCTGGCCTGGCCGACCCCGAGACGCACGATCGATGTGCGCCCCGAGGCTAGGCTCGCCGT

NciI
ScrFI
Sth132I
BslI |
MspI |
BslI | |
EciI | | |
BscGI | | | |
Sth132I | | | |
DpnI | | | |
Sau3AI | | | |
| | | |
FauI
Sth132I |
ThaI | |
Hpy178III |
MnlI
EarI | |
| | |
AGGCGATCTTCCCCGTGCCGGGAAATCCGCCCCGCGTTGCTTCTTTTTTACGAAGAGAG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCCGCTAGAAGGGGCACGGCCCTTTAGGCGGGGCGCAACGAAGAAAAAAGTGCTTCTCTC

HhaI
Cac8I |
HhaI |
MboII | CviRI
ThaI | BseRI |
BssHII | MwoI | |
| | | | |
TspRI
MslI |
Bst4CI | |
DraIII | |
| | | |
AciI
MnlI |
BsiHKAI | |
AciI Bsp1286I | |
| | |
GAGCGCGCCCTTTGCAGAACGCACACAGTGATGTTTTTGGCGGAGGACACGGCGGAGAGGC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CTCGCGCGGGAAACGTCTTGCGTGTGTCACTACAAAAACGCCTCTCGTGCCGCCTCTCCG

```


Figura 65. (continuación)

```

                                MaeIII
                                Tsp45I
                                CjeI
ThaI
AciI |
Fnu4HI |
HaeII |
TauI |
HhaI |
NlaIV ||
BsaHI |||
NarI |||
HgaI BanI ||||
| | | | |

                                ScrFI
                                BsaJI |
                                BstXI |
                                CviJI |
                                EcoRI ||
                                MnlI ||
                                BfaI |||
| | | | |

                                CviJI
                                HaeIII
                                Sau96I |
                                Fnu4HI ||
                                TauI ||
                                AciI |||
| | | | |

                                MnlI |
                                BslI |||||
                                BsrFI |||||
                                NgoAIV |||||
| | | | |

TCTGTCTGGCGCCGCTCCTCCCACTAGCCTGGGAGGGCGGCCCTCTGCCGGCTCCGTC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
AGACAGACCGCGCGCAGGAGGGTGATCGGACCCTCCCGCCGGGAGACGGCCGAAGGCAG

                                MnlI
                                TaqII |
                                AciI ||
                                MnlI |||
                                MwoI |||
                                MnlI |||
                                SfcI |||
                                AlwNI |||
                                CviJI |||
| | | | |

                                AciI
                                Fnu4HI |
                                TauI |
                                AciI |
                                BsrBI |
                                BseRI ||
                                Cac8I |||
                                CjeI |||
| | | | |

                                BsrI
                                CviJI |
                                HphI ||
                                BbvI | | BbvI
                                BsgI | | MwoI
| | | | |

ACCCAGCCTCTGTAGCGGAGGAGGGGGGAGCGAGCGGCGGTGAAACGCCGAAGCCAGTAG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TGGGTCGGAGACATCGCCTCCTCCCCCTCGCTCGCCGCCACTTTGCGGCTTCGGTCATC

                                BsrBI
                                AciI |
                                Fnu4HI |
                                TauI |
                                CviJI |
                                TspRI ||
                                Fnu4HI |||
                                CviRI ||||
                                HphI ||||
                                TseI ||||
                                BtsI ||||
                                PstI ||||
                                CviRI | ||||
                                Fnu4HI | | ||||
                                SfcI | | ||||
                                TseI | | ||||
                                TspRI | | ||||
                                Bst4CI | | | ||||
                                CviRI | | | ||||
                                Fnu4HI | | | ||||
                                HaeII | | | ||||
                                HhaI | | | ||||
                                TseI | | | ||||
Eco47III | | | ||||
| | | | |

                                BseMII
                                MnlI
                                Hpy188IX |
                                DpnI | |
                                Hpy188IX | |
                                Sau3AI | |
                                HaeIV | |
                                Hin4I | |
                                DdeI | |
                                BsgI | |
                                Hpy188IX | |
                                BbvI | |
| | | | |

CGCTGCACTGTGCTGCAGTGCAGCCGCTCACCTATCCGACCTCAGATCAGACGAG
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1195
GCGACGTGACACGACGTCACGTCGGCGAGTGGATAGGCTGGAGTCTAGTCTGCTC
ITS-2 (inv)

```


Figura 66. Mapa de restricción correspondiente a los productos de PCR de almeja italiana (*R. philippinarum*), obtenidos tras la amplificación con los cebadores ITS-1/ITS-2. Los sitios de unión de los oligonucleótidos ITS-1/ITS-2 e ITS-3/ITS-4 se muestran en verde y azul, respectivamente. La región del ADNr 5,8S se encuentra sombreada en azul claro y las dianas de las enzimas de restricción *Rsa* I (5'-GT↓AC-3') y *Hinf* I (5'-G↓ANTC-3') se muestran sombreadas en morado y naranja, respectivamente.

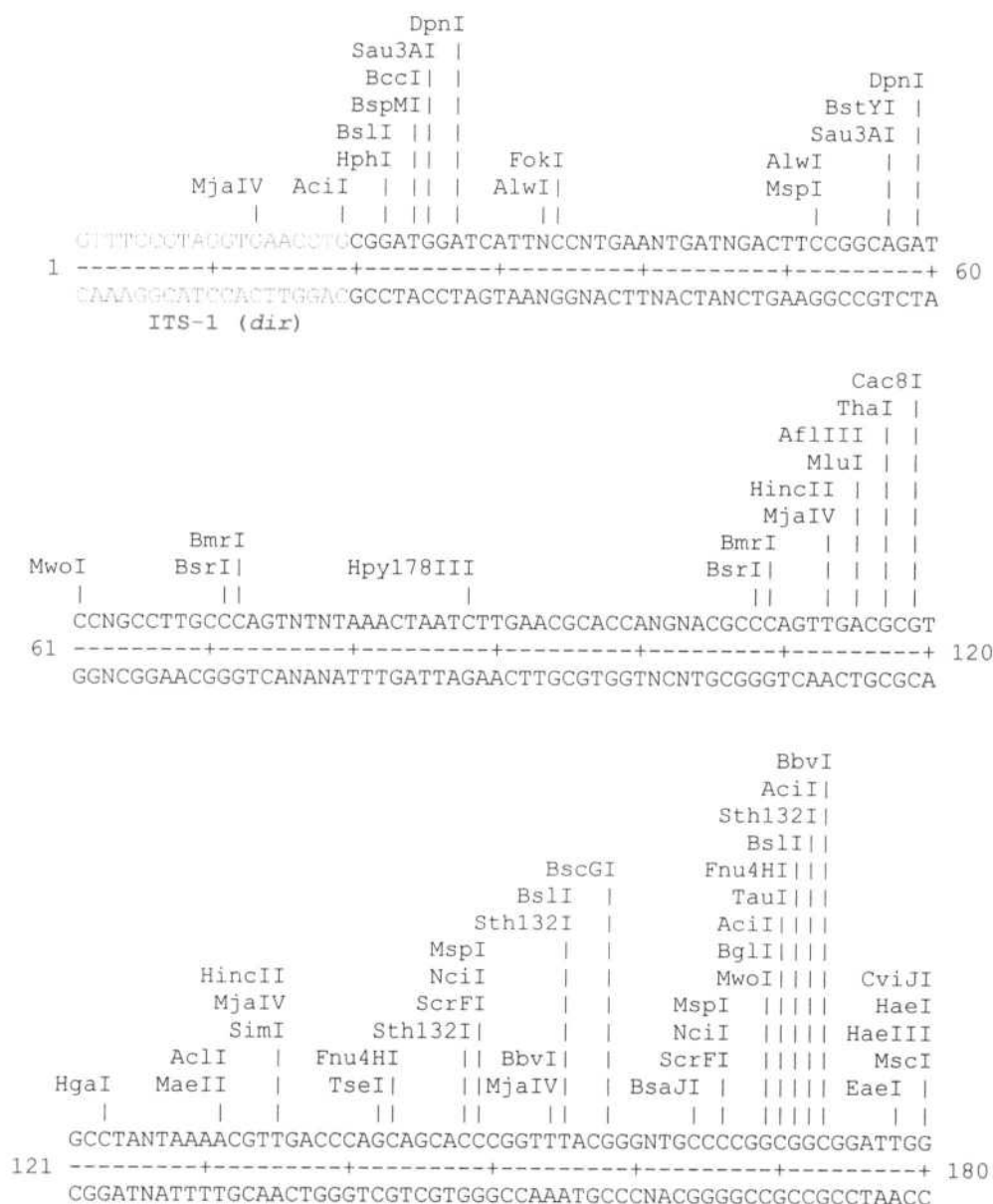


Figura 66. (continuación)

```

                                BbvI
                                Sth132I |
                                BbvI | |
                                CviJI | |
                                MspI   HaeIII | |
                                EciI   | EaeI | | |
                                Fnu4HI | Fnu4HI | | |
                                MspAlI | | GdiII | | |
                                MwoI   | | TauI | | |
                                TseI   | | AcI | | | |
                                AcI | | | BslI | | | |
                                | | | | | | | |
                                CCACCGCTGCCGGACTGCGGCCACCACTTCGGGCTGCTGCTGGAAAAAGTCGGGAGCCGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
                                GGTGGCGACGGCCTGACGCCGGTGGTGAAGCCCGACGACACCTTTTCAGCCCTCGGCA

                                BsaJI
                                BstDSI
                                Fnu4HI |
                                TaqII  | |
                                TspRI  | |
                                CviJI  | |
                                ScrFI   BceFI | | |
                                HphI   | Hin4I | | |
                                HinfI   BsaJI | Bst4CI | | | MwoI | HaeII | BanI | | | |
                                AcI |   TfiI | EcoRII | BstXI | | | TseI | HhaI | BbvI | | | |
                                | |   | | | | | | | | | | | | | | | |
                                CCGCCAGAGGTGATTCCCACCCAGGACAGTGGCTCTCGCAGCGCCGTGGGGTGCCGGCGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
                                GCGGTCTCCACTAAGGGTGGGTCTGTACCGAGAGCGTCGCGGCACCCACGGCCGCC

                                BfaI
                                BsmFI
                                MnlI
                                NciI |
                                ScrFI |
                                BsaJI | |
                                MspI | |
                                BslI | | |
                                CviJI | | |
                                SimI | HinfI HaeIII | | |
                                BsiEI | | TfiI Sth132I EaeI | | | |
                                TaqI  | | TaqI | MnlI | GdiII | | | |
                                | | | | | | | | | | | | | | | |
                                TCGAGGACCCTCGAATCGCTCCCTTTGGCCGGGGAGCGAGGAACGGTCCCGGACCTAGTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
                                AGCTCCTGGGAGCTTAGCGAGGGAAACCGCCCTCGCTCCTTGCCAGGGCCTGGATCAA

```


Figura 66. (continuación)

```

FauI
MspI|
Sth132I|
BsaWI||
BsmAI |||
BsmBI |||
Sth132I | |||
CviJI | | |||
Sth132I | | | |||
AvaI | | | |||
NlaIV|| | | | |||
CviJI||| | | | |||
HaeIII||| | | | |||
Sau96I||| | | | |||
BglI |||| | | | |||
MspI |||| | | | |||
MwoI |||| | | | |||
NciI |||| | | | |||
ScrFI |||| | | | |||
CviJI | |||| | | | |||
Sth132I Cac8I | | |||| | | | |||
Fnu4HI| CviJI | | |||| | | | |||
TauI| BfaI | | | |||| | | | |||
AciI| SimI | | | |||| | | | |||
BsrBI| BscGI| | | | |||| | | | |||
| | | | | | | |||| | | | |||
AGAGCGGCGAAGGACGGGTCTAGCCAGCCCGGCCCGAGCCGAAACCGGAGACGCGGGGA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
TCTCGCCGCTTCTCTGCCAGATCGGTCTGGGCGGGGCTCGGCTTTGGCCTCTGCGCCCT

```

```

AciI
Fnu4HI
Hin4I
TauI
BsaHI |
PleI | |
Hpy188IX | | |
HinfI HinfI
BsaXI| Hpy188IX| | | |
BpmI Hin4I|| SimI || | | |
CviJI | MmeI ||| BccI | | | | |
HaeIII | PleI | ||| BslI| | | | | HgaI
| | | | | | | ||| | | | |
GACAGGCCGACTGACGACGACGACTCCAGCGATGGGGTCGGAGTCCGATGACGCCGCTC
1081 -----+-----+-----+-----+ 1140
CTGTCCGGCTGACTGCTGCTGCTGAGGTGCTACCCAGCCTCAGGCTACTGCGGCGGAG

```

```

BseMII
MnlI |
Hpy188IX|
DpnI || |
FauI Hpy188IX | | |
FokI Hpy188IX Sau3AI | | |
Sth132I| MnlI |HaeIV | | | |
MnlI || ApoI | |Hin4I | | | |
AciI | | Tsp509I | |DdeI| | | | |
| | | | | | | ||| | |
AACCCCGCACCACCTCCAAAAAATTCATCCGACCTCAGATGAGACGAG
1141 -----+-----+-----+-----+ 1188
TTGGGGCGTGGTGGAGGTTTTTTAAGTAGGCTGGAGTCTAGTCTGCTC
ITS-2 (inv)

```

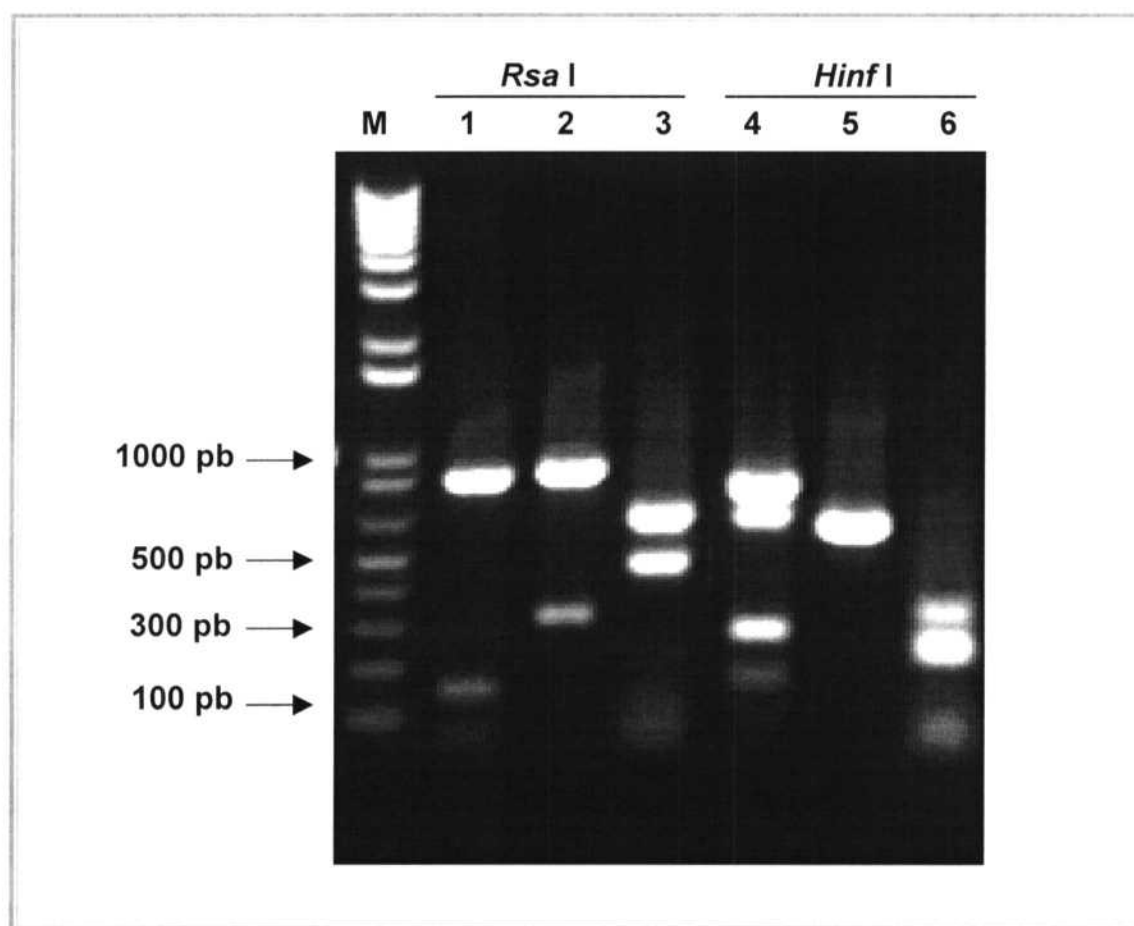


Figura 67. Perfil de restricción de los productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS-1/ITS-2 a partir de almeja babosa (*V. pullastra*) (1, 4), almeja fina (*R. decussatus*) (2, 5) y almeja italiana (*R. philippinarum*) (3-6). Muestras digeridas con la enzima *Rsa* I (1-3) y digeridas con la endonucleasa *Hinf* I (4-6). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

La enzima *Hinf* I solo tiene una diana de restricción en los productos de PCR de almeja fina y produce dos fragmentos de 603 pb y 592 pb, mientras que en los productos de PCR de la almeja italiana, dicha enzima presenta seis dianas de restricción que dan lugar a siete fragmentos de 331 pb, 252 pb, 233 pb, 225 pb, 67 pb, 61 pb y 19 pb. En el mapa de restricción de la almeja babosa (*Figura 64*), la endonucleasa *Hinf* I tiene dos dianas de restricción que deberían dar lugar a tres fragmentos de 643 pb, 271 pb y 161 pb. No obstante, la digestión de los productos de PCR de la almeja babosa con la enzima *Hinf* I dio lugar a un fragmento adicional de 804 pb en todos los individuos analizados, junto con los fragmentos esperados de 643 pb, 271 pb y 161 pb (*Figura 67*). Esto puede ser debido a una digestión incompleta en la diana de restricción de la enzima G↓ANTC presente en la posición 286 (*Figura 63*).

Cabe destacar, que la resolución del gel de agarosa de la *Figura 67* no permite visualizar los fragmentos de ADN menores de 30 pb procedentes de la digestión. Además, el gel de agarosa no separa completamente fragmentos de ADN que difieren en pocos nucleótidos en longitud. Por esta razón, el perfil de restricción obtenido con la enzima *Hinf* I a partir de la almeja fina (*R. decussatus*) (*Figura 67*, línea 5), aparece como una única banda que correspondería a los dos fragmentos de ADN de 603 pb y 592 pb. Del mismo modo, una de las bandas observadas en el perfil electroforético obtenido al cortar los productos de PCR de la almeja italiana (*R. philippinarum*) con la enzima *Hinf* I (*Figura 67*, línea 6) incluye tres fragmentos de 252 pb, 233 pb y 225 pb, mientras que otra banda contiene dos fragmentos de 67 pb y 61 pb. El perfil electroforético obtenido a partir de las tres especies de almejas analizadas, no mostró polimorfismo intraespecífico en ninguno de los 15 individuos analizados.

IV.1.4.3. GEN MITOCONDRIAL 16S ARNr

IV.1.4.3.1. Amplificación por PCR y secuenciación

Utilizando los cebadores universales 16SAR y 16SBR (sección III.2.2.3.) y las condiciones descritas en la sección III.2.6.3., se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb del gen 16S ARNr a partir del ADN de las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia (*Figura 68*).

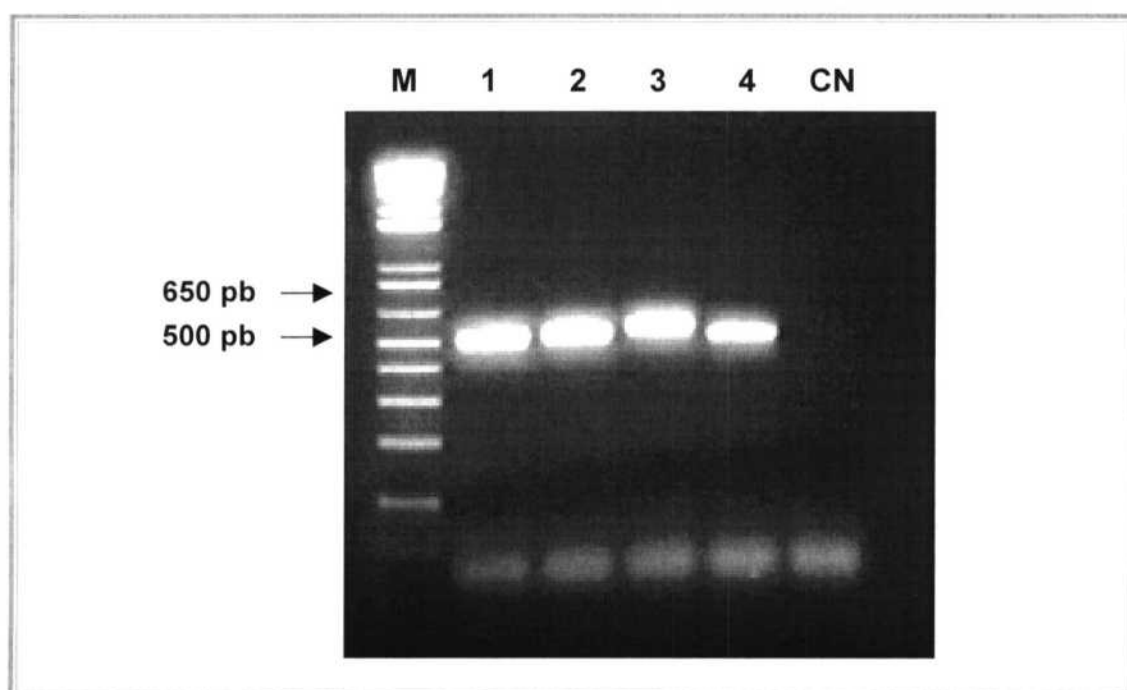


Figura 68. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 16S ARNr amplificados con los cebadores 16SAR y 16SBR. Las muestras son (1) almeja babosa; (2) almeja fina; (3) almeja italiana y (4) almeja rubia. CN= control negativo. M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

Los productos de PCR del gen 16S ARNr de una muestra de almeja babosa, fina, italiana y rubia se purificaron según se describe en la sección III.2.8.1., y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando un secuenciador automático ABI PRISM modelo 377 y el kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing. Cada producto de PCR se secuenció en ambas direcciones, empleando los cebadores 16SAR y 16SBR. La secuencia parcial obtenida con el cebador 16SAR se superpuso con la inversa y complementaria de la obtenida con el oligonucleótido 16SBR, con el fin de obtener la secuencia completa de cada producto de PCR. Mediante un análisis detallado de los picos de los registros se trataron de identificar las bases que el secuenciador automático dejó como indeterminaciones (N). En las Figuras 69 y 70, se muestran los registros gráficos y las secuencias nucleotídicas obtenidas en la secuenciación de un producto de PCR de almeja italiana con los cebadores 16SAR (Figura 69) y

16SBR (*Figura 70*). Tras la secuenciación se comprobó que la longitud de los productos de PCR obtenidos a partir de muestras de las cuatro especies de almejas fue de 511 pb en la almeja babosa, 523 pb en la almeja fina, 545 pb en la almeja italiana y 502 pb en la almeja rubia. La longitud de los productos de PCR obtenidos a partir de las especies de almejas, fue similar a la longitud obtenida por otros investigadores amplificando con los mismos cebadores el ADN de la especie de mejillón *Mytilus edulis*, que fue de 527 nucleótidos (Rawson y Hilbish, 1995).

La *Figura 71* muestra la alineación y comparación de las secuencias del fragmento del gen 16S ARNr de almeja babosa, fina, italiana y rubia obtenidas en este trabajo, junto con la secuencia de la especie de mejillón *Mytilus edulis* (Número de acceso U22864) obtenida de la base de datos EMBL. Aunque, los porcentajes de homología entre las secuencias de las cuatro especies de almejas y del mejillón *Mytilus edulis* estuvo comprendida entre un 50-60%, la homología entre los productos de PCR de la almeja fina y las especies de almejas babosa, italiana y rubia fue de un 80,58%, 78,86% y 79,11% respectivamente.

IV.1.4.3.2. Selección de endonucleasas y análisis de restricción

Con el programa MAP se construyeron los mapas de restricción de los productos de PCR del gen 16S ARNr de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia. Una vez estudiados los mapas de restricción (*Figuras 72-75*), se seleccionaron endonucleasas apropiadas para la diferenciación de estas cuatro especies de almejas.

Como resultado de la comparación de los mapas de restricción de las secuencias disponibles, y siguiendo criterios de especificidad de especie y disponibilidad comercial, se eligieron las enzimas de restricción *Bsm* AI y *Bsr* I. Los fragmentos resultantes de la digestión de los productos de PCR con las endonucleasas *Bsm* AI y *Bsr* I se separaron en un gel de agarosa MS-8 al 3% para observar los perfiles de restricción.

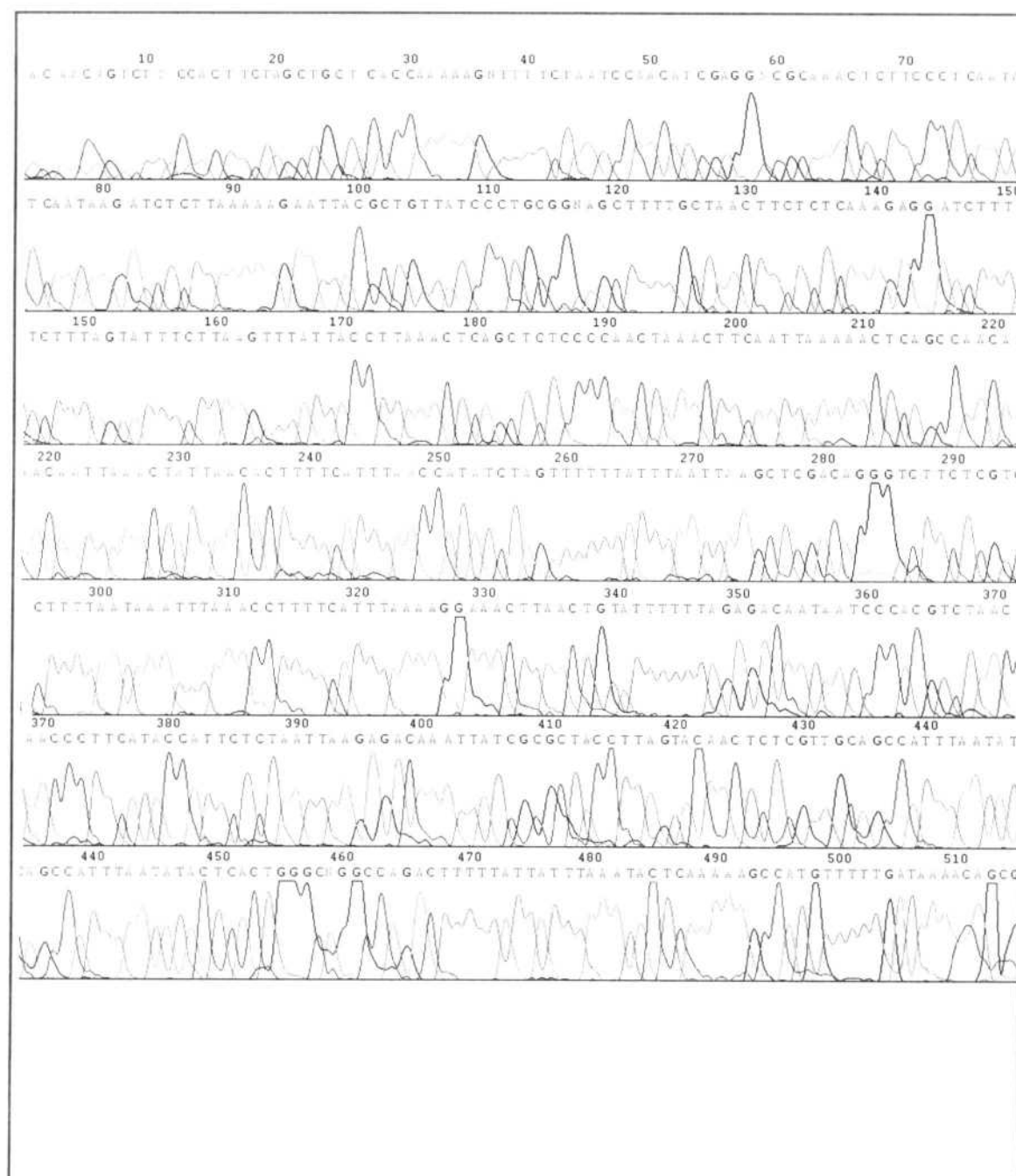


Figura 70. Registro gráfico y secuencia nucleotídica de un producto de PCR del gen 16S ARNr de almeja italiana, utilizando el oligonucleótido 16SBR como cebador en la reacción de secuenciación.

Figura 71. Secuencias de ADN obtenidas a partir de los productos de PCR del gen 16S ARNr de las cuatro especies de almejas (babosa, fina, italiana y rubia), alineadas con la secuencia de la especie de mejillón *Mytilus edulis* (U22864). Las dianas de restricción para las enzimas *Bsm* AI: 5'-[GTCTC(N)₁↓]-3'; 3'[CAGAG(N)₅↓]5', y *Bsr* I: 5'[ACTGGN↓]3'; 3'[TGAC↓CN]5', se muestran sombreadas en naranja y azul, respectivamente. La secuencia de los cebadores 16SAR (directo) y 16SBR (inverso) empleados para la amplificación y secuenciación de los productos de PCR se muestran en verde.

	1	16SAR (dir)				50
<i>V. pullastra</i>	ATCAAAAACA	TCGCTTCTCG	GTAACCTA..	..GATGGGAA	GTCGGGCCTG	
<i>R. decussatus</i>	ATCAAAAACA	TCGCTTTTTC	AAACCTA..	..AATAAAAA	GTCGAGCCTG	
<i>V. rhomboides</i>	ATCAAAAACA	TCGCTTTTTC	AGATTTAA..	..AATGGGAA	GTCGGGCCTG	
<i>R. philippinarum</i>	ATCAAAAACA	TCGCTTTTTC	AGTATTTAAA	.TAATAAAAA	GTCTGGCCTG	
U22864TTCCTTTTC	ATGTAAGTAA	AAGGTAGTCC	CTGCCAGTG	
	51	Bsr I				100
<i>V. pullastra</i>	CCCGGT.GTG	ACACAA....	.TAAACGGCT	GCAATGAGAG	TTGTA..CTA	
<i>R. decussatus</i>	CCCGGT.GAG	GTATAT....	.TAAACGGCT	GCAACGAGAG	TTGTA..CTA	
<i>V. rhomboides</i>	CCAGT GGAG	AGTTAC....	.TAAATGGCT	GCAACTAG.T	TTGTA..CTA	
<i>R. philippinarum</i>	CCAGT GAGT	ATAT.....	.TAAATGGCT	GCAACGAGAG	TTGTA..CTA	
U22864	CAACTAGAGT	AATGTCTGTT	GTAAACGGCG	GCGTTAACGT	GAGCGTCTTA	
	101	Bsm AI				150
<i>V. pullastra</i>	AGGTAGCGCG	ATAATTT GTC	TCTT AATTGG	AGAATGGTAT	GAAAGGTTTG	
<i>R. decussatus</i>	AGGTAGCGCG	ATAATTT GTC	TTTTAATTGA	AGAATGGTAT	GAAAGGCTCG	
<i>V. rhomboides</i>	AGGTAGCGCG	GTAATTT GTC	CCTTAATTGG	GGGATGGTAT	GAAAGGCTTG	
<i>R. philippinarum</i>	AGGTAGCGCG	ATAATTT GTC	TCTT AATTAG	AGAATGGTAT	GAAGGGTTAG	
U22864	AGGTAGCGCG	ATAATTT GCT	TTTCAATTGA	AGGATGGTAT	GAAAGGGTTA	
	151	Bsm AI				200
<i>V. pullastra</i>	ACGCAGATCA	GTT. GTCTCT	TAGAAAAAAG	GTGAAGTTTC	CTTTTAAATG	
<i>R. decussatus</i>	TCGCAAGT.T	GCTT GTCTCT	GAAAAAGAAA	GCGAAGTTTC	CTTTTAAATG	
<i>V. rhomboides</i>	TCTTAAGT.T	TTTT GTCTCA	AAAAGACAAA	GTGAAGTTTC	CTTTTAGATG	
<i>R. philippinarum</i>	ACGTGGGA.T	TATT GTCTCT	AAAAAATACA	GTGAAGTTTC	CTTTTAAATG	
U22864	ACGAAGAAGG	TGCTGTGTCT	AAAAATTCAA	TTTAAACTAA	CTTTAAGGTG	
	201					250
<i>V. pullastra</i>	AGAAGG..TT	TAAATTTGAA	TAAAAGACGA	GAAGACCCTG	CCGAGCTTAA	
<i>R. decussatus</i>	AAAAGG..TT	TAAGTAAAGA	TAAAAGACGA	GAAGACCCTA	TTGAGCTTAA	
<i>V. rhomboides</i>	AAAAGG..TC	TAAATAAAAA	TAAAAGACGA	GAAGACCCTG	TCGAGCTTAA	
<i>R. philippinarum</i>	AAAAGG..TT	TAAATTT.AT	TAAAAGACGA	GAAGACCCTG	TCGAGCTTAA	
U22864	AAGAGGCCTT	TATGTAAAAG	AAG..GACGA	CAAGACCCTA	TGAAGCTTTA	

Figura 71. (continuación)

	251				300
<i>V. pullastra</i>	TTAGGT....TTGG	TAGGATTGGA
<i>R. decussatus</i>	TCAGGT....TTTA	AATTTTATGT
<i>V. rhomboides</i>	TTAAAC....TAAG	GATGATAG..
<i>R. philippinarum</i>	TTAAATAAAA	AACTAGATAT	GGTTAAATGA	AAAGTGTTAA	TAGTTTAATT
U22864	TCTTAA....TTGG	AGCTTTCAGG
	301				350
<i>V. pullastra</i>	GAGTT...GT	TATTAGGTTG	AATGGTAGTT	GGGGAGAGCT	GAGCTTTAGA
<i>R. decussatus</i>	GTGATTACTA	TTTAAACTA	AAGTGTGGTT	GGGGAAAGCT	AGATTTAAGA
<i>V. rhomboides</i>AA	TTTTTAGTCA	AAATGTAGTT	GGGGAAAGTT	AGGCTTGAGA
<i>R. philippinarum</i>	GTTGGCTGAG	TTTTTAATTG	AAGTTTAGTT	GGGGAGAGCT	GAGTTTAAGG
U22864	CTCTTATACG	ATTTTGATGG	GAGATCAGTA	...GAAACAA	GTCTTCTACT
	351				400
<i>V. pullastra</i>	GAATAGGTTT	TAAAAGACAA	GGATCCTCTT	TAGAGAGAAA	A.TAGGTAGA
<i>R. decussatus</i>	AAACAAGTCT	ATAATAGGCG	AAGATCCTCC	TCGGGAGATA	ATTGGT.AAA
<i>V. rhomboides</i>	TAATAAGCTT	TTTAAGGTGA	AGATCCTTTT	T...GAGAGA	AATTAGCAAA
<i>R. philippinarum</i>	TAATAAACTT	AAGAAATACT	AAAGATCCTC	TTT.GAGAGA	AGTTAGCAAA
U22864	ATCACATTAA	TCTTACTAGT	ATTTCCCTAAC	TTTATATGTG	TGGCTAGCTA
	401		Bsr I		450
<i>V. pullastra</i>	AGCTACCGCA	GGGATAACAG	.CGTAATTTT	TCTTGAGAGA	TCT...TATT
<i>R. decussatus</i>	AGCTACCGTA	GGGATAACAG	.CGTAATCTT	TCTTGAGAGA	TCT...TATT
<i>V. rhomboides</i>	AGCTACCGCA	GGGATAACAG	.CGTAATCTC	TCT CCAGT GG	CATAGCTATT
<i>R. philippinarum</i>	AGCTACCGCA	GGGATAACAG	CCGTAATTCT	TTTTAAGAGA	TCT...TATT
U22864	CTCTAGGGAT	AACAGCGCAAT	TTCTCCCGAA	AGATGGTATT
	451				500
<i>V. pullastra</i>	GAGGGAAAAG	TTTGCGACCT	CGATGTTGGA	TTAGAAAAAC	TCCTTGGTGC
<i>R. decussatus</i>	GAGGGAAAGG	TTTGCGACCT	CGATGTTGGA	TTAGAAAAAC	TTCTTGGTGC
<i>V. rhomboides</i>	TAGAGGGGGG	TTTGCGACCT	CGATGTTGGA	TTAGAAAAAC	TTCTTGGCTA
<i>R. philippinarum</i>	GAGGGGAAGAG	TTTGCNACCT	CGATGTTGGA	TTANAAAAAC	TTTTTGGTGT
U22864	GGAGGGGAAG	ATTGTGACCT	CGATGTTGGC	TTTAGATATC	CTAGAGGCGT
	501	Bsm AI		Bsm AI	550
<i>V. pullastra</i>	AGGAGCTAAG	GAAAGTGAGA	CTGTTTCG...TTCT	TTTAAACTTC
<i>R. decussatus</i>	AGCAGCTAAG	AGTAGTGAGA	CTGTTTCGTCT	CTTCCCATCT	AAGTTACCGA
<i>V. rhomboides</i>	GATGTCAA..	AATAGTGAGA	CTGTTTC.... GTCT	CTTAAACTTC
<i>R. philippinarum</i>	AGCAGCTAGA	AGTTGTAAGA	CTGTTTC....GTCT	TTTAAATTTTC
U22864	AGAAGCTTCT	GAA.....
	551	16SBR (<i>inv</i>)			573
<i>V. pullastra</i>	TACGTGATCT	GAGTTCAAAC	CGG		
<i>R. decussatus</i>	GACGTGATCT	GAGTTCAGAC	CGG		
<i>V. rhomboides</i>	TACGTGATCT	GAGTTCAAAC	CGG		
<i>R. philippinarum</i>	TACGTGATCT	GAGTTCAAAC	CGG		
U22864		

Figura 72. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja babosa (*V. pullastra*) amplificado con los cebadores 16SAR (directo) y 16SBR (inverso). Las secuencias de los cebadores se muestran en verde, y las dianas de restricción de la enzima *Bsm* AI: 5'-[GTCTC(N)₁↓]-3'; 3'[CAGAG(N)₅↓]5' se muestran sombreadas en naranja.

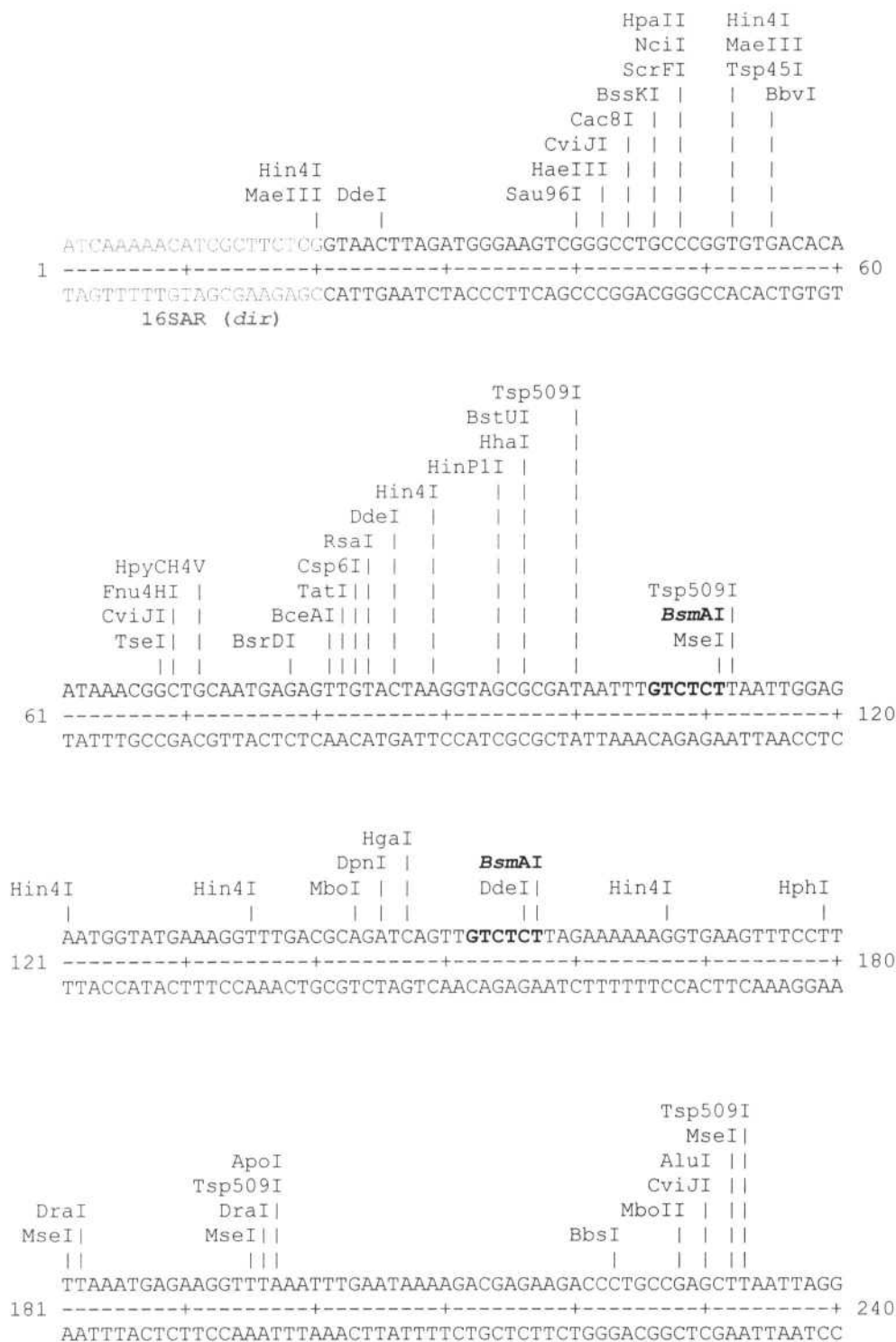


Figura 72. (continuación)

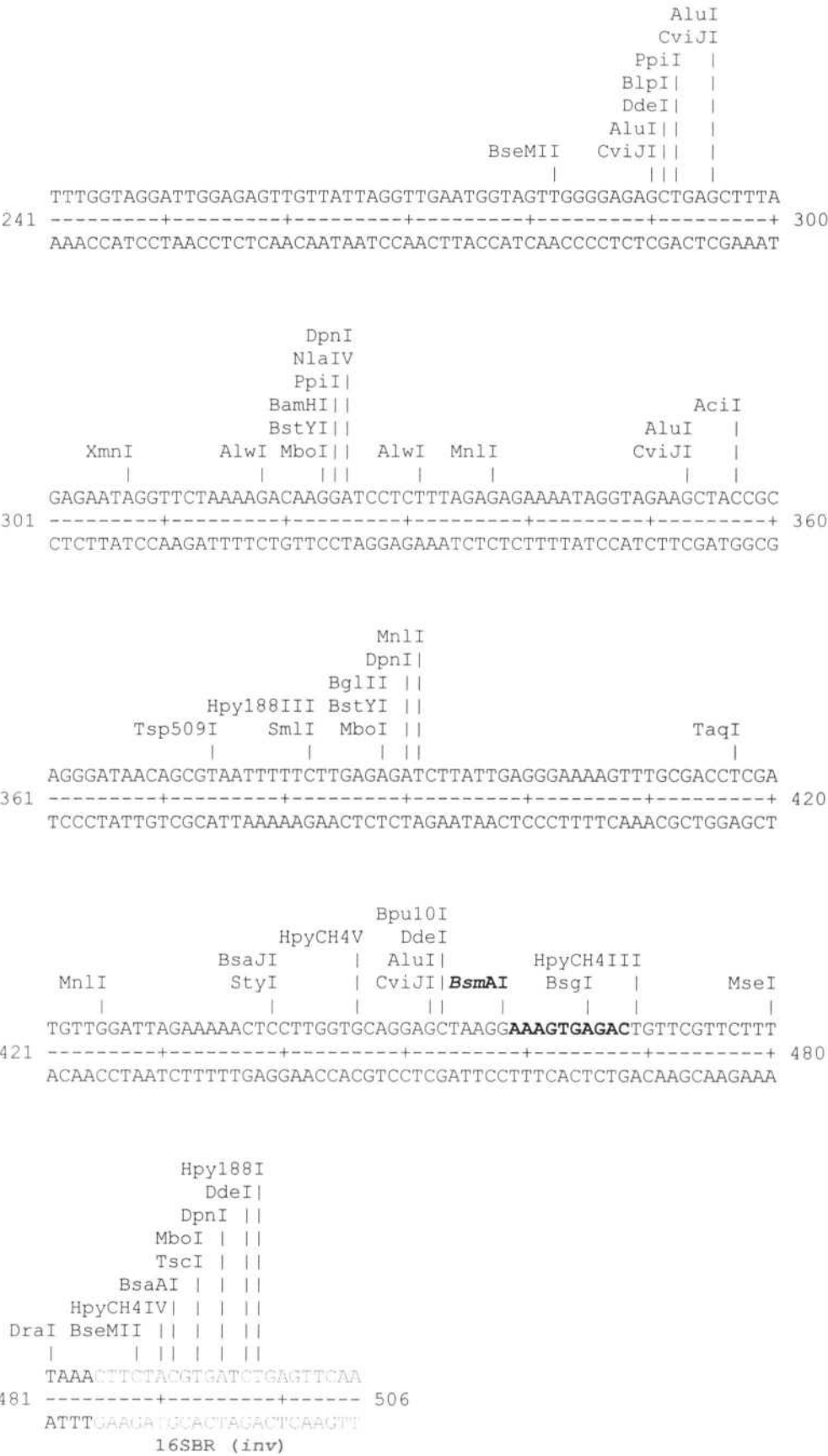


Figura 73. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja fina (*R. decussatus*) amplificado con los cebadores 16SAR (directo) y 16SBR (inverso). Las secuencias de los cebadores se muestran en verde, y las dianas de restricción de la enzima *Bsm* AI: 5'-[GTCTC(N)₁↓]-3'; 3'[CAGAG(N)₅↓]5' se muestran sombreadas en naranja.

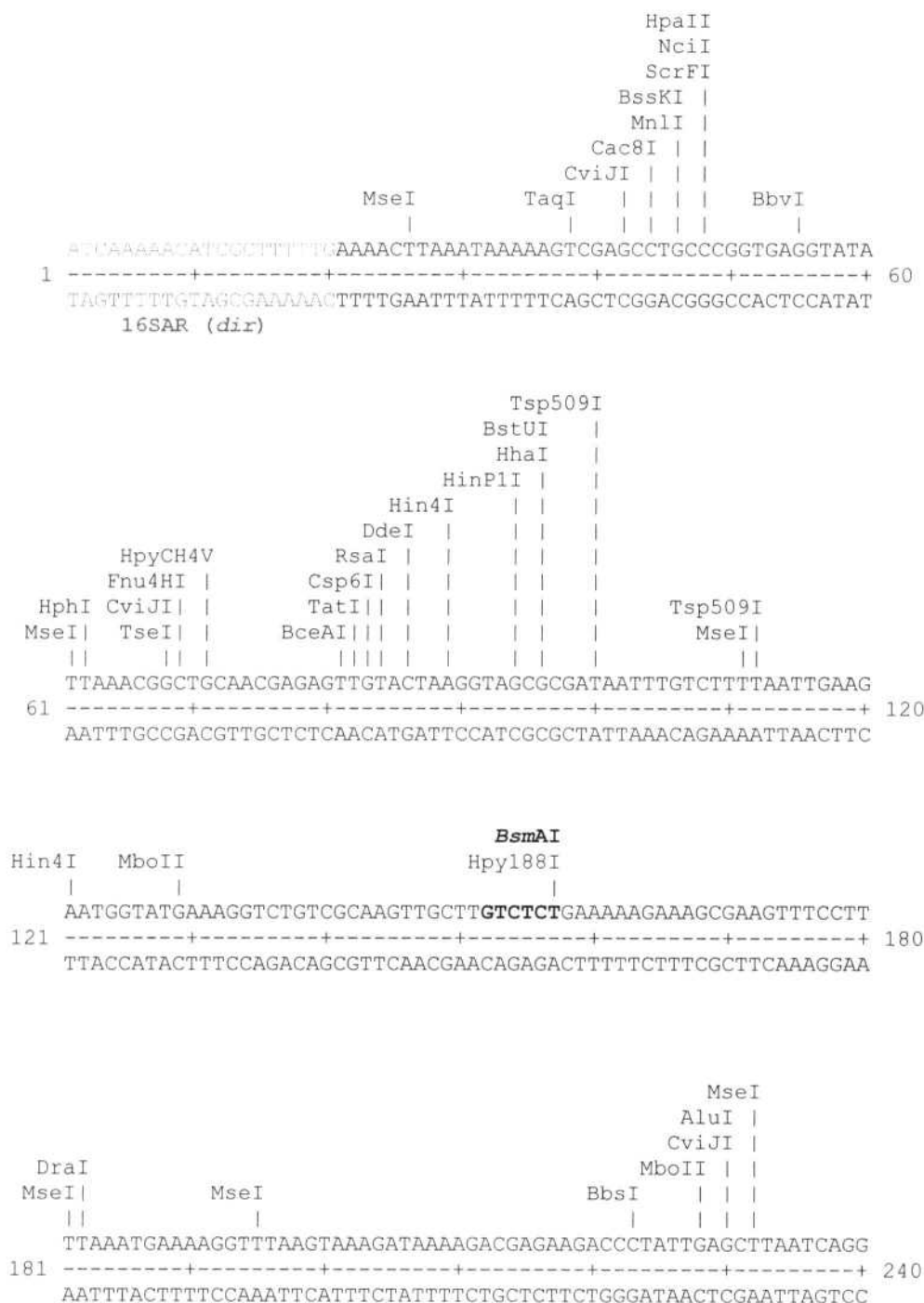


Figura 73. (continuación)

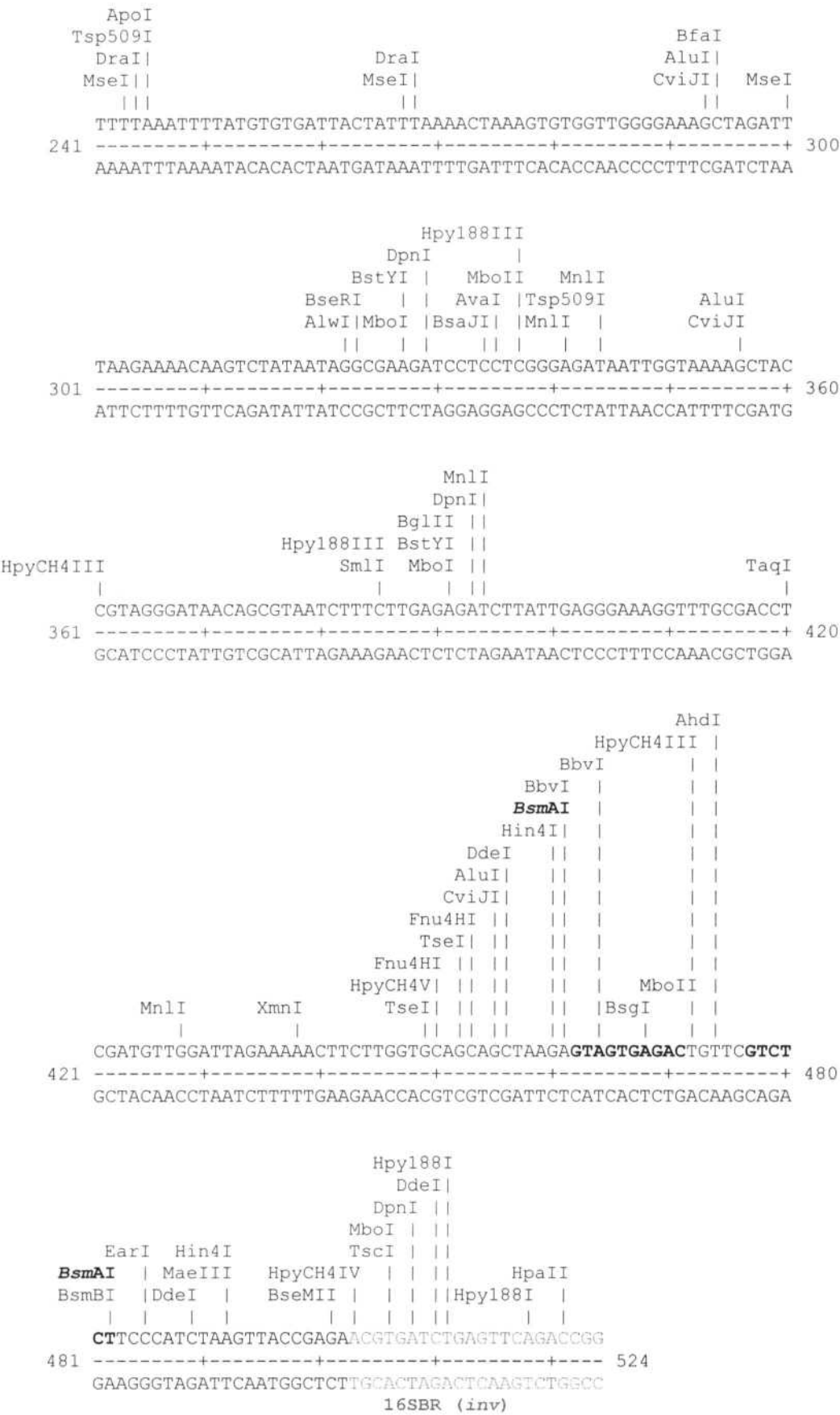


Figura 74. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja italiana (*R. philippinarum*) amplificado con los cebadores 16SAR (directo) y 16SBR (inverso). Las secuencias de los cebadores se muestran en verde y las dianas de restricción para las enzimas *Bsm* AI: 5'-[GTCTC(N)₁↓]-3'; 3'[CAGAG(N)₅↓]5', y *Bsr* I: 5'[ACTGGN↓]3'; 3'[TGAC↓CN]5', se muestran sombreadas en naranja y azul, respectivamente.

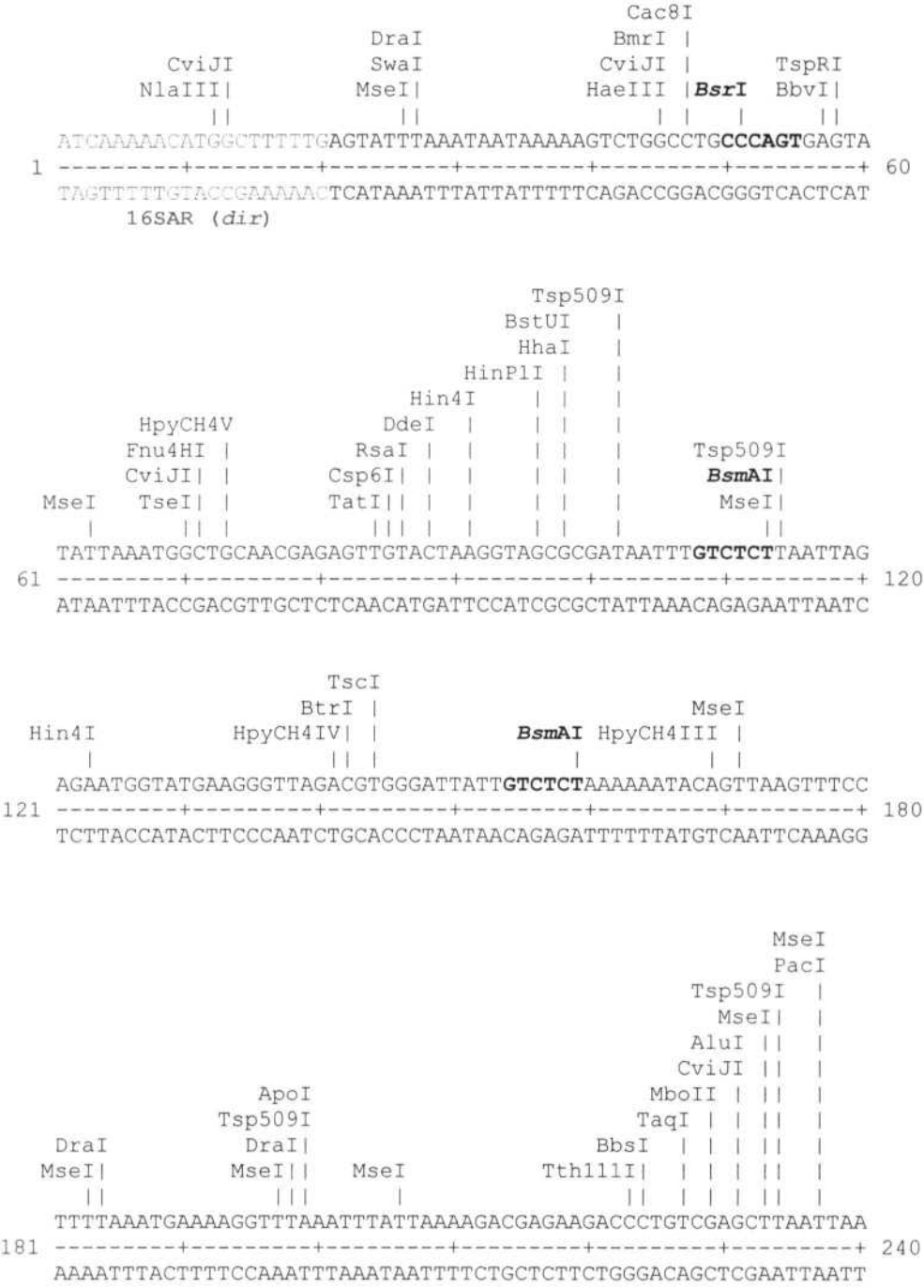


Figura 74. (continuación)

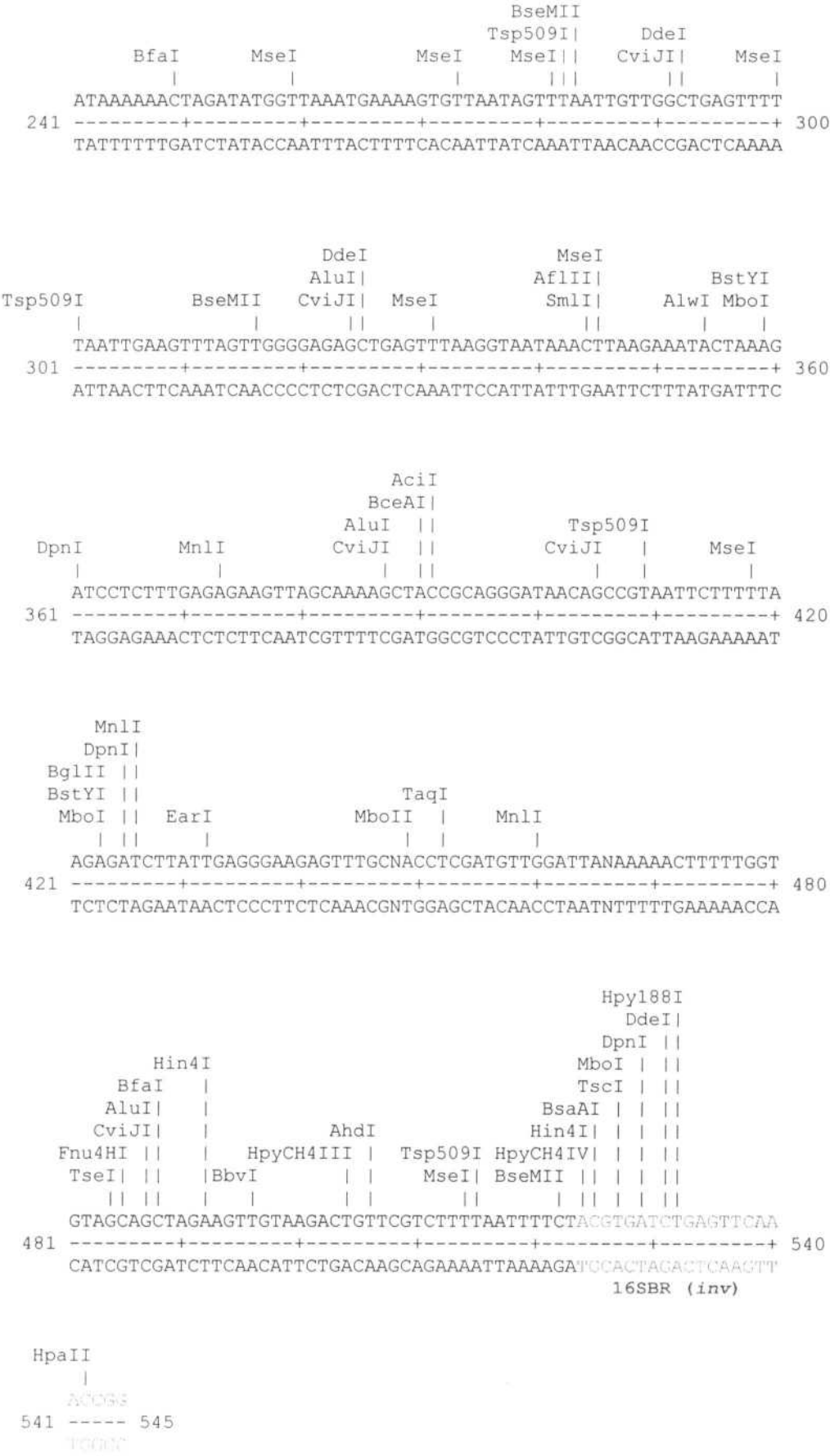


Figura 75. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja rubia (*V. pullastra*) amplificado con los cebadores 16SAR (directo) y 16SBR (inverso). Las secuencias de los cebadores se muestran en verde y las dianas de restricción para las enzimas *Bsm* AI: 5'-[GTCTC(N)₁↓]-3'; 3'[CAGAG(N)₅↓]5', y *Bsr* I: 5'[ACTGGN↓]3'; 3'[TGAC↓CN]5', se muestran sombreadas en naranja y azul, respectivamente.

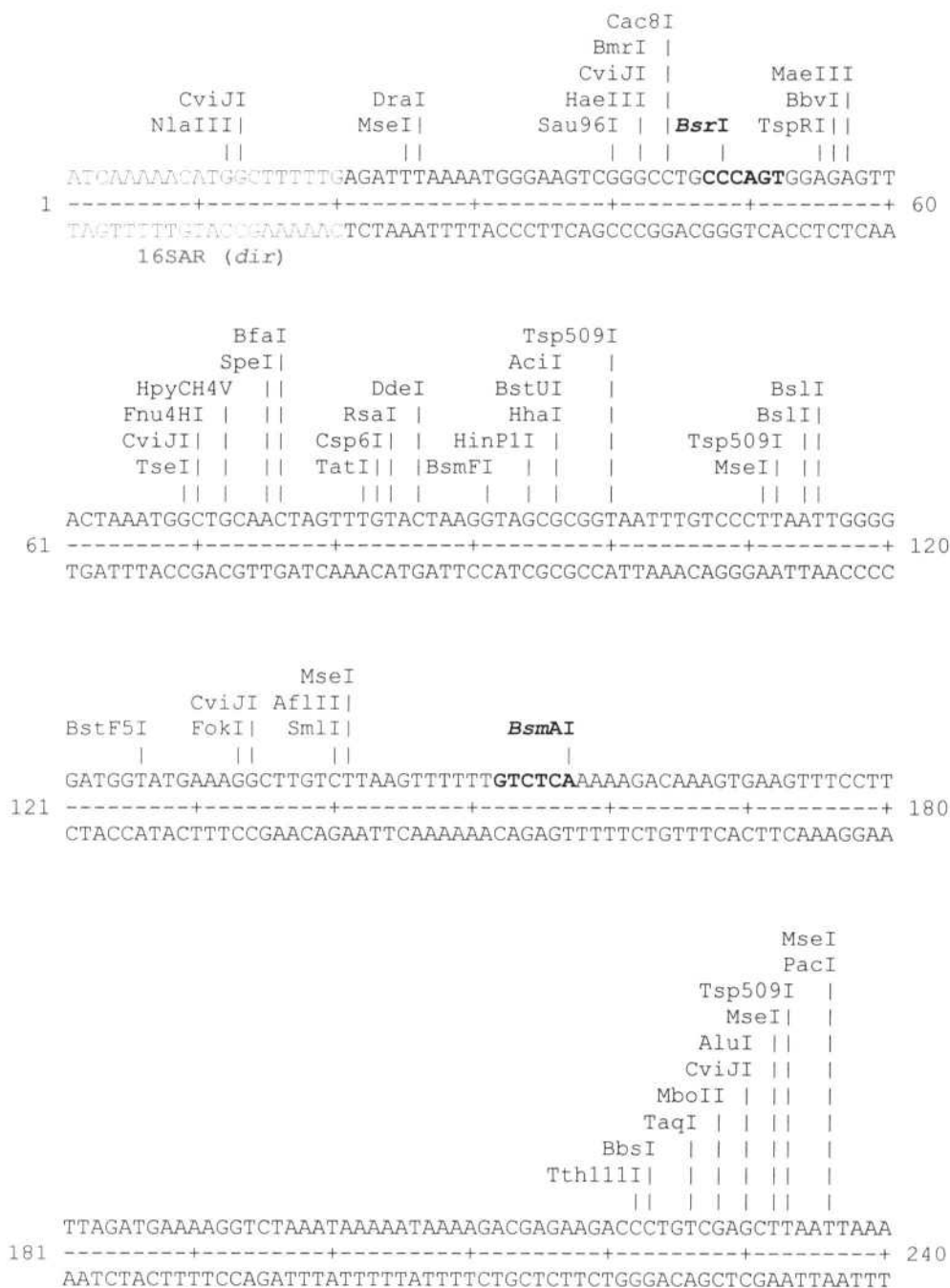
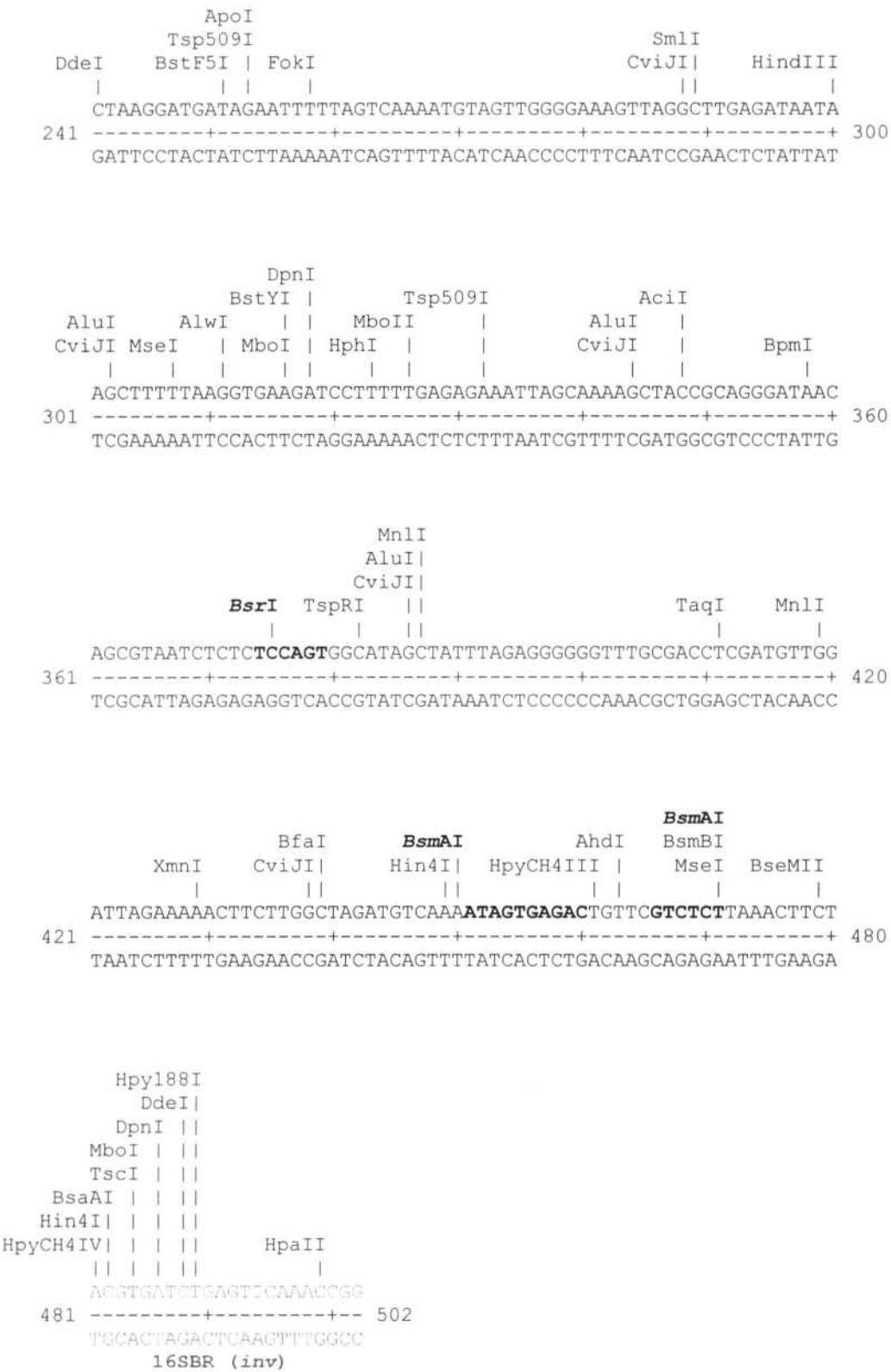


Figura 75. (continuación)



En la *Figura 76*, se muestran los resultados obtenidos después de la digestión de los productos de PCR del gen 16S ARNr de almeja babosa, fina, italiana y rubia con las enzimas seleccionadas. En las secuencias de almeja babosa, fina y rubia existen tres dianas de restricción para la enzima *Bsm* AI que dieron lugar a cuatro fragmentos de ADN de 302 pb, 111 pb, 52 pb y 46 pb en la almeja babosa; 304 pb, 157 pb, 41 pb y 21 pb en la almeja fina; y 293 pb, 158 pb, 30 pb y 21 pb en la almeja rubia. Sin embargo, existen dos dianas de restricción para esta enzima en la almeja italiana, que dieron lugar a tres fragmentos de 386 pb, 113 pb y 46 pb. Asimismo, la enzima *Bsr* I sólo tiene una diana de restricción en los productos de PCR de la almeja italiana que dio lugar a dos fragmentos de 494 pb y 51 pb, y dos dianas de restricción en la almeja rubia que dieron lugar a tres fragmentos de 328 pb, 126 pb y 48 pb. Sin embargo, la endonucleasa *Bsr* I no corta los productos de PCR de las especies de almejas babosa y fina.

Los resultados obtenidos tras el análisis de restricción de las muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia no mostraron variación intraespecífica entre los 15 individuos analizados de cada especie.

IV.1.4.4. GEN ARGININA QUINASA

IV.1.4.4.1. Amplificación por PCR y secuenciación

A partir del ADN complementario (ADNc) obtenido según los protocolos descritos en la sección III.2.5.2., se amplificó en las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, un fragmento de 300 pb utilizando los oligonucleótidos AKrna/AKom y las condiciones descritas en el apartado III.2.6.4.1. Asimismo se amplificó un fragmento de 700 pb empleando la pareja de cebadores oligo-dT-adaptor/AKalm y las condiciones del apartado III.2.6.4.2.

Los productos de PCR amplificados con los cebadores AKrna y AKom, correspondientes a un individuo de cada una de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, se secuenciaron en ambas direcciones en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, empleando para ello los mismos cebadores que en la amplificación.

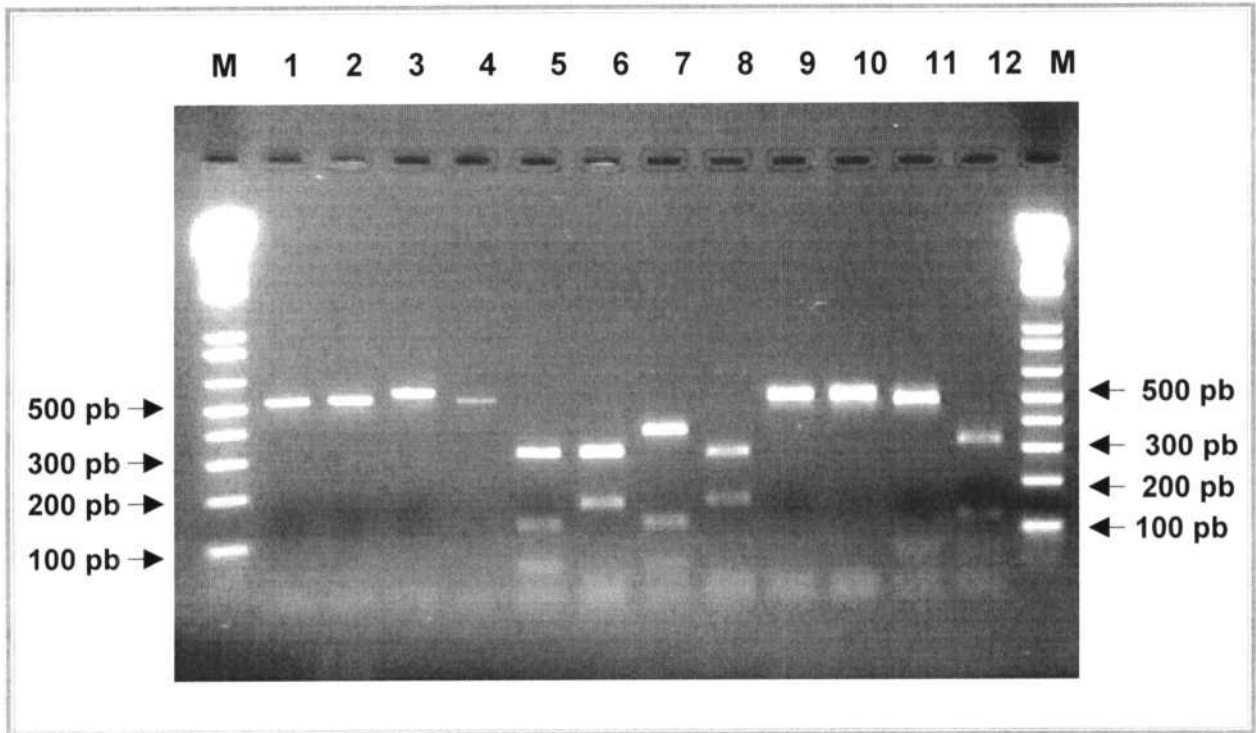


Figura 76. Perfiles de restricción de los productos de PCR del gen 16S ARNr obtenidos de muestras de almeja babosa (1, 5, 9), fina (2, 6, 10), italiana (3, 7, 11) y rubia (4, 8, 12). Muestras sin digerir (1-4) y digeridas con las endonucleasas *Bsm* AI (5-8) y *Bsr* I (9-12). M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

La secuencia parcial obtenida con el cebador AKrna se superpuso con la inversa y complementaria de la obtenida con el oligonucleótido AKom con el fin de determinar la secuencia completa de cada producto de PCR. El análisis comparativo de las secuencias obtenidas a partir del fragmento de 300 pb, permitió diseñar un cebador específico denominado AKalm, situado entre los nucleótidos 143-164 de la secuencia nucleotídica amplificada (*Figura 77*).

Para la amplificación del extremo 3' del ADNc que codifica la enzima arginina quinasa se emplearon los oligonucleótidos oligo-dT-adaptor y AKalm. Con estos cebadores, se amplificó un fragmento de 700 pb en las especies de almeja babosa, fina, italiana y rubia (*Figura 78*). Estos fragmentos fueron purificados y clonados, siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.8.2. Posteriormente, los productos de PCR amplificados con los cebadores M13F y M13R, una vez purificados, se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de la U. C. M., empleando los cebadores del vector. Tras la secuenciación de estos fragmentos, se observó que los registros gráficos obtenidos con el cebador AKalm dieron lugar a picos bien definidos. Sin embargo, no se obtuvieron secuencias nítidas en los registros obtenidos con el cebador oligo-dT-adaptor.

En los 390 pb secuenciados en las cuatro especies de almejas, la homología entre las secuencias obtenidas de las almejas babosa y fina fue de 85,78%, entre las almejas babosa e italiana fue de 86,45%, y entre babosa y rubia 87,46%. En la *Figura 77*, se muestran las secuencias del ADNc que codifican la enzima arginina quinasa en las muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia analizadas en este trabajo, alineadas con las secuencias procedentes de dos especies de moluscos, *Battilus cornutus* y *Pseudocardium sachalinensis*, obtenidas de la base de datos *GenBank* (AB017255 y AB008011, respectivamente). También se indican los lugares de unión de los cebadores AKrna, AKom y AKalm. Los porcentajes de homología observados entre las secuencias de ADNc que codifican la enzima arginina quinasa en la almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), con respecto a las secuencias de las dos especies de moluscos obtenidas a partir de la base de datos *GenBank* se muestran en la *Tabla 20*.

Figura 77. Secuencias nucleotídicas correspondientes a un fragmento del ADNc de la enzima arginina quinasa, obtenidas a partir de muestras de almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), alineadas con las secuencias de las especies de moluscos *Pseudocardium sachalinensis* y *Battilus cortunus* obtenidas de la base de datos GenBank (AB017255 y AB008011, respectivamente). Las secuencias correspondientes a la pareja de cebadores AKrna (directo)/AKom (inverso) y el oligonucleótido AKalm (directo) se muestran en verde y azul, respectivamente. Los tripletes que codifican los residuos de triptófano y cisteína se encuentran sombreados en naranja y azul, respectivamente. (N) base no identificada.

	1	AKrna (dir)					50
<i>R. decussatus</i>	GT	TGG	TGA	ATGAGGAGGA	NCATCTTCGT	CTGATCTCAA	TGCAGAAAGG
<i>R. philippinarum</i>	GT	TGG	TGA	ATGAGGAGGA	NCATCTTCGT	CTGATCTCAA	TGCAGAAAGG
<i>V. pullastra</i>	GT	TGG	TNA	ATGAGGAGGA	NCATCTTCGT	CTCATCTCTA	TGCAGAAAGG
<i>V. rhomboides</i>	GT	TGG	TGA	ATGAGGAGGA	NCATCTTCGT	CTGATCTCAA	TGCAGAAAGG
<i>P. sachalinensis</i>	ACC	TGG	TGG	GAGAAGAAGA	TCATTTGCGT	CTGATCTCAA	TGCAGAAAGG
<i>B. cornutus</i>	GT	TGG	TGA	ACCAGGAGGA	CCATCTGCGT	CTTATCTCCA	TGCAGAAGGG
	51						100
<i>R. decussatus</i>	TGGAGATCTT	GGTGGTGTAT	ACAGACGCCT	TGTCAAGGCC	ATTGGTGAGT		
<i>R. philippinarum</i>	TGGAGATTG	GGAGGTGTAT	ACAGACGTCT	GGTCAAGGCC	ATCGGTGAGT		
<i>V. pullastra</i>	TGGAGATCTC	GGCGGTGTAT	ACAGACGTCT	TGTTAAGGCT	ATCGCGGAGT		
<i>V. rhomboides</i>	TGGAGATCTA	AGTCGTGTAT	ACCGACGTCT	CGTCAAGGCC	ATCGGTGAGT		
<i>P. sachalinensis</i>	AGGTGATTG	GGAGCCGTAT	ACAGACGTCT	TGTTAAGGCC	ATTAATGAAC		
<i>B. cornutus</i>	AGGCAACCTG	GCCGCCGTGT	ACAGAAGACT	CTGTCAGGCC	ATAACAACCTA		
	101						150
<i>R. decussatus</i>	TAGAGAAGA.	..AACTTACA	TTTGCAAAAA	GAGACGGTTA	TG	CTAATCT	
<i>R. philippinarum</i>	TGGAGAAAA.	..AACTGACA	TTTGCTAAAA	GGGACGGCTA	TG	CTAATCT	
<i>V. pullastra</i>	TGGAGAAGA.	..AACTGACA	TTTGCGAAAA	GAGACGGCTA	TG	CTAATCT	
<i>V. rhomboides</i>	TGGAGAAGA.	..AACTGACA	TTTGCTAAAA	GGGATGGCTA	TG	CTAATCT	
<i>P. sachalinensis</i>	TCGAGAAAA.	..AATTGGCA	TTTGCCAAGA	AAGATGGCTA	CGGTTATCTG		
<i>B. cornutus</i>	TGCAGAACAG	TGGTTTGTCC	TTGCGCAAAC	GAGAAGGGCT	TGGTTACCTG		
	151	AKalm (dir)					200
<i>R. decussatus</i>	CAATCT	GGGAACCACC	CTTAGAGCTA	GCGTACACAT			
<i>R. philippinarum</i>	CAATCT	TGGAACCACC	CTTAGAGCTA	GCGTACACAT			
<i>V. pullastra</i>	TAATCT	GGAACGACA	CCTCGAGCTA	GTGTACACAT			
<i>V. rhomboides</i>	CAATTT	GGAACACTACA	CTTAGAGCAA	GTGTACACAT			
<i>P. sachalinensis</i>	CATCCAATTT	GGGTACTACA	TTGAGAGCTA	GCGTACACAT			
<i>B. cornutus</i>	CCAGCAACTT	GGAACAGCA	CTCCGTGCCT	CAGTGCACAT			

Figura 77. (continuación)

	201				250
<i>R. decussatus</i>	GAAGATACCA AATGTATCT. ..AAACAACC	AAACTTCAAA	GAGGAGTGTG		
<i>R. philippinarum</i>	GAAGATACCA AATGTATCT. ..AAACAACC	AAACTTCAAA	GAGGAGTGTG		
<i>V. pullastra</i>	GAAGATCCCC AATGTTTGC. ..AAGCAAGC	AGACTTCAAA	ACAGTGTGTG		
<i>V. rhomboides</i>	GAAGATTCCG AATGTATGC. ..AAACATCC	AGACTTCAAA	GCAAAATGTG		
<i>P. sachalinensis</i>	GCAGATTCCCT AATGTGTGT. ..AAACAGCC	CAACTTCAAG	GAATTCTGCG		
<i>B. cornutus</i>	GAAGGTCCCC AACCTAGCTG	CCAAAGCTGA	TGAATTCAAA	GCAATCTGTG	
	251		AKom (inv)		300
<i>R. decussatus</i>	AAAAATACAA CATTCAACCA	AGAGGTATTC	ATGGTGAGCA	CTCTGAGAGT	
<i>R. philippinarum</i>	AAAAATACAA CATTCAACCA	AGAGGTATTC	ATGGTGAGCA	CTCTGAGAGT	
<i>V. pullastra</i>	AAGAATACAA CATAACGCA	AGAGGTATTC	ACGGCGAGCA	CTCTGAGAGT	
<i>V. rhomboides</i>	AACAGTATAG CATTCAAGCC	AGAGGTATTC	ACGGCGAGCA	CTCTGAGAGT	
<i>P. sachalinensis</i>	AGAAATTCTC TATCCAACCA	AGAGGCATTC	ACGGAGAGCA	CTCTGAGAGC	
<i>B. cornutus</i>	AGAAGTACAA TATCCAAGCA	CGGGGTATTC	ACGGCGAGCA	CACCGAGAGT	
	301				350
<i>R. decussatus</i>	GAGGGAGGCG TATACGATCT	GTCAAACAAG	CGCCGACTTG	GTCTGACTGA	
<i>R. philippinarum</i>	GAGGGAGGCG TATACGATCT	GTCAAACAAG	CGTCGACTTG	GTCTGACTGA	
<i>V. pullastra</i>	GAAGGTGGCG TGTACGATCT	CTCCAACAAA	CGTCGGCTCG	GTCTGACCGA	
<i>V. rhomboides</i>	GAAGGTGGTG TGTACGATCT	GTCCAACAAG	CGTCGACTTG	GTCTGACTGA	
<i>P. sachalinensis</i>	GAGGGAGGAG TTTACGATCT	GTCAAACAAA	CGTCGTCTAG	GACTCACTGA	
<i>B. cornutus</i>	GAAGGCGGTG TATACGATCT	GTCCAACAAA	CGTCGTCTGG	GTCTCACCGA	
	351				400
<i>R. decussatus</i>	ATACGATGCC GTGAGGGAAA	TGTTGAATGG	CGTTTTGAAA	TTGAAGGCAT	
<i>R. philippinarum</i>	ATACGATGCC GTGAGGGAAA	TGTTGAATGG	CGTTTTGAAA	~~~~~	
<i>V. pullastra</i>	ATACGCCGCC GTTAGGGAAA	TGTTGAATGG	TGTATTGAAA	TTAAACNAT	
<i>V. rhomboides</i>	ATACGCAGCC GTAAGGGAAA	TGTTGGATGG	TGTATTGAA~	~~~~~	
<i>P. sachalinensis</i>	ATACGAAGCC GTCAGAGAAA	TGTTGAACGG	TGTTCTTGAG	ATCAAGAAGT	
<i>B. cornutus</i>	GTACCAGGCT GTCATGGAGA	TGAAAACAGG	AGTCGAAGAG	ATTCTCAAAA	
	401				450
<i>R. decussatus</i>	GGGAAATTGA ACTTGCTGGA	GGAAAGAA~~	~~~~~	~~~~~	
<i>R. philippinarum</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
<i>V. pullastra</i>	GGGAANTTGN ACTTGCCGGA	CAGCAAAAGN	AGTAAAAAGT	GAATTTAANA	
<i>V. rhomboides</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
<i>P. sachalinensis</i>	GGGAGGAGAC ACTTGCTGCT	GGCAAGAAAT	AAACTATATT	AATTTAGAAA	
<i>B. cornutus</i>	GAGAGAAAGA ACTGGAAGGA	GCGAAGGGGG	CGAAGAAGTA	GTCGGAGTGA	
	451				500
<i>R. decussatus</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
<i>R. philippinarum</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
<i>V. pullastra</i>	AAGANGTTTT GATGATGGGG	TGNCCAAAAT	TAAGACT~~~	~~~~~	
<i>V. rhomboides</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
<i>P. sachalinensis</i>	CACCTTAAAT TGACAGTTTG	TGTGTTATCC	AAAGACTTAA	AACAGTATTT	
<i>B. cornutus</i>	AACTCTGCCC GGATACATTC	CAGTATTGTG	CAGCAAGTGT	AAATACGTGC	

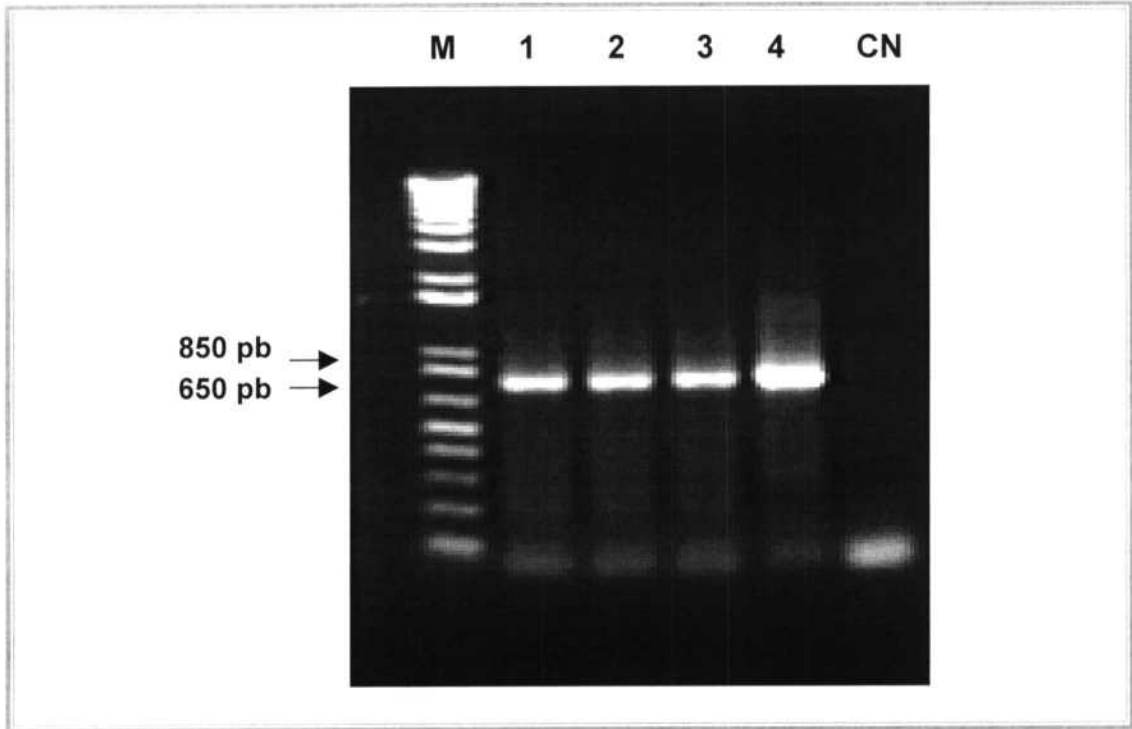


Figura 78. Análisis electroforético de los productos de PCR de 700 pb del gen arginina quinasa amplificados con los cebadores oligo-dT-adaptor y AKalm. Muestras de almejas: (1) babosa, (2) fina; (3) italiana; (4) rubia. M= marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder. CN= control negativo.

Tabla 20. Porcentajes de homología entre los fragmentos de ADNc de arginina quinasa de distintas especies de almejas y otros moluscos.

	<i>V. pullastra</i>	<i>R. decussatus</i>	<i>R. philippinarum</i>	<i>V. rhomboides</i>
<i>P. sachalinensis</i>	69,43	76,54	79,16	75,71
<i>B. cornutus</i>	64,86	65,64	67,7	68,66
<i>V. pullastra</i>	-	85,78	86,45	87,46
<i>R. decussatus</i>	85,78	-	95,83	86,68
<i>R. philippinarum</i>	86,45	95,83	-	87,72
<i>V. rhomboides</i>	87,46	86,68	87,72	-

IV.1.4.4.2. Análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de la enzima arginina quinasa para el estudio de fragmentos peptídicos específicos de las especies de almejas

Mediante el programa TRANSLATE (GCG), se transformaron las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de las cuatro especies de almejas objeto de estudio en secuencias aminoacídicas. Posteriormente, se hizo un estudio comparativo de éstas y las secuencias aminoacídicas de la enzima arginina quinasa en las especies de moluscos *Pseudocardium sachalinensis* y *Battilus cortunus*, obtenidas de la base de datos *GenBank* (AB017255 y AB008011, respectivamente). En la *Figura 79*, se muestra la comparación y alineación de las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, con las secuencias de *P. sachalinensis* y *B. cortunus*. La enzima arginina quinasa en la especie *P. sachalinensis* está formada por 724 aminoácidos y consta de dos dominios. La comparación de las secuencias aminoacídicas obtenidas en las cuatro especies de almejas se hizo con el segundo dominio (que está entre los aminoácidos 364 al 724), ya que es el que tiene actividad enzimática. Sin embargo, la secuencia nucleotídica de la enzima arginina quinasa en *B. cornutus* codifica una proteína de 358 residuos. Conviene señalar que el primer aminoácido que aparece en la *Figura 79*, corresponde con los aminoácidos 563 y 213 de las secuencias aminoacídicas de la arginina quinasa en *P. sachalinensis* y *B. cornutus*, respectivamente.

La homología entre las secuencias aminoacídicas obtenidas en las almejas fina e italiana fue del 100%. Sin embargo, la homología entre las secuencias aminoacídicas de las almejas fina y babosa fue de 90,71% y entre las almejas fina y rubia fue de 91,33%. En la *Tabla 21*, se muestran los porcentajes de homología entre las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de las especies de almejas babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), y las secuencias aminoacídicas de la arginina quinasa en los moluscos *P. sachalinensis* y *B. cornutus*.

Figura 79. Secuencias aminoacídicas de un fragmento de la enzima arginina quinasa, deducidas a partir del ADNc de almeja babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), y alineadas con las secuencias aminoacídicas de la arginina quinasa de los moluscos *Pseudocardium sachalinensis* y *Battilus cortunus* obtenidas de la base de datos GenBank (AB017255 y AB008011, respectivamente). Las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de los cebadores Akrna, Akom y AKalm se muestran en verde y azul. Los residuos de triptófano y cisteína se encuentran sombreados en naranja y azul, respectivamente. Los aminoácidos que difieren en alguna de las cuatro especies de almejas analizadas en este trabajo aparecen en morado.

	1	Akrna (dir)		AKalm (dir)50
<i>R. decussatus</i>	VWVNEEXHLR	LISMQKGGDL	AVYRRLVKA	IGELEKK.LT FAKRDGYGYL
<i>R. philippinarum</i>	VWVNEEXHLR	LISMQKGGDL	AVYRRLVKA	IGELEKK.LT FAKRDGYGYL
<i>V. pullastra</i>	VWVNEEXHLR	LISMQKGGDL	AVYRRLVKA	IGELEKK.LT FAKRDGYGYL
<i>V. rhomboides</i>	VWVNEEXHLR	LISMQKGGDL	AVYRRLVKA	IGELEKK.LT FAKRDGYGYL
<i>P. sachalinensis</i>	TWVGEEDHLR	LISMQKGGDL	GAVYRRLVKA	INELEKK.LA FAKKDGYGYL
<i>B. cornutus</i>	VWVNEEDHLR	LISMQKGGNL	AAVYRRLCQA	ITTMQNSGLS FAKREGLGYL
Triptófano				
	51			AKom (inv)100
<i>R. decussatus</i>	TFPCPSNLGTT	LRASVHMKIP	NV.VKQENFK	EECEKYNIQP RGIHGEHSES
<i>R. philippinarum</i>	TFPCPSNLGTT	LRASVHMKIP	NV.VKQENFK	EECEKYNIQP RGIHGEHSES
<i>V. pullastra</i>	TFPCPSNLGTT	PRASVHMKIP	NV.VKQAEFK	TVCEKYNIQP RGIHGEHSES
<i>V. rhomboides</i>	TFPCPSNLGTT	LRASVHMKIP	NV.VKHEDFK	AECEKYNIQP RGIHGEHSES
<i>P. sachalinensis</i>	TFPCPSNLGTT	LRASVHMQIP	NV.CKQPNFK	EFCEKFISIQP RGIHGEHSES
<i>B. cornutus</i>	TFPCPSNLGTA	LRASVHMKVP	NLAAKADEFK	AICEKYNIQA RGIHGEHSES
Cisteína				
	101			150
<i>R. decussatus</i>	EGGVYDLSNK	RRGLLTEYQA	VREMLGVLK	LKAWIELAG GK~~~~~
<i>R. philippinarum</i>	EGGVYDLSNK	RRGLLTEYQA	VREMLGVLK	~~~~~
<i>V. pullastra</i>	EGGVYDLSNK	RRGLLTEYQA	VREMLGVLK	LKXWEXXLAG QQKX*KVNLX
<i>V. rhomboides</i>	EGGVYDLSNK	RRGLLTEYQA	VREMLGVL~	~~~~~
<i>P. sachalinensis</i>	EGGVYDLSNK	RRGLLTEYEA	VREMLNGVLE	IKKWEETLAA GKK*TILI*K
<i>B. cornutus</i>	EGGVYDLSNK	RRGLLTEYQA	VMEMKTGVEE	ILKREKELEG AKGAK*SE*

Tabla 21. Porcentajes de homología entre las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de la arginina quinasa para las distintas especies de almejas, y las de otros moluscos.

	<i>V. pullastra</i>	<i>R. decussatus/ R. philippinarum</i>	<i>V. rhomboides</i>
<i>P. sachalinensis</i>	77,98	89,28	88,18
<i>B. cornutus</i>	72,6	75,71	78,74
<i>V. pullastra</i>	-	93,8	92,91
<i>R. decussatus/R. philippinarum</i>	93,8	-	91,5
<i>V. rhomboides</i>	92,91	91,5	-

Utilizando el programa PEPTIDE STRUCTURE del paquete informático GCG, las regiones menos hidrofílicas (índices hidrofílicos comprendidos entre -0,200 y -1,6) de los 130 residuos aminoacídicos deducidos a partir del ADNc de la arginina quinasa fueron del 25 al 31, 48 al 54, 65 al 66 y 120 al 127 en la almeja babosa; del 25 al 31, 48 al 54, 61 al 69, 120 al 127 en las almejas fina e italiana; y del 25 al 31, 48 al 54, 61 al 69 y 114 al 127 en la almeja rubia (Figura 79).

IV.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA (*V. pullastra*), FINA (*R. decussatus*), ITALIANA (*R. philippinarum*) Y RUBIA (*V. rhomboides*) MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Para llevar a cabo la identificación de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia mediante técnicas inmunoenzimáticas, se prepararon extractos antigénicos de proteínas solubles de cada una de las especies. Estos extractos antigénicos se emplearon para producir anticuerpos policlonales en conejos y anticuerpos monoclonales en ratones. Una vez obtenidos los inmunosueros, se valoró la especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a las proteínas solubles de almeja babosa, fina, italiana y rubia y se pusieron a punto técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para la identificación específica de las especies de almejas. Asimismo, se seleccionaron hibridomas productores de anticuerpos monoclonales

específicos frente a proteínas de almeja fina. A continuación, se indican los resultados obtenidos en la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a proteínas solubles de las especies de almejas objeto de estudio.

IV.2.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS

Los extractos antigénicos frente a las proteínas solubles de almejas babosa, fina, italiana y rubia se prepararon según se describe en la sección III.3.1.1. Para la obtención de los anticuerpos policlonales, se emplearon extractos antigénicos liofilizados extraídos a partir de varios individuos de cada una de las especies de almejas: babosa (PSB), fina (PSF), italiana (PSI) y rubia (PSR). Sin embargo, para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina, además de extractos antigénicos liofilizados, se emplearon extractos sin liofilizar (PSF2).

El contenido proteico de los extractos se determinó utilizando el protocolo de determinación de proteína *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), descrito en la sección III.3.1.2. La concentración de proteína de los extractos antigénicos liofilizados fue:

- Almeja babosa (PSB): 230 μg proteína/mg de extracto liofilizado
- Almeja fina (PSF): 175 μg proteína/mg de extracto liofilizado
- Almeja italiana (PSI): 130 μg proteína/mg de extracto liofilizado
- Almeja rubia (PSR): 175 μg proteína/mg de extracto liofilizado

Asimismo, se determinó la concentración proteica de los extractos líquidos obtenidos de cada uno de los individuos de cada especie. En las condiciones de extracción descritas en el apartado III.3.1.1., las concentraciones proteicas de todos los extractos líquidos estuvieron comprendidas entre 6.000-10.000 μg proteína/mL de extracto líquido. El extracto antigénico líquido de almeja fina (PSF2) tenía una concentración proteica de 10.000 μg proteína/mL de extracto líquido.

IV.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DE ALMEJA BABOSA (*V. pullastra*), FINA (*R. decussatus*), ITALIANA (*R. philippinarum*) Y RUBIA (*V. rhomboides*)

Para la obtención de los inmunosueros se emplearon 4 lotes de 2 conejos cada uno, que se inmunizaron con los extractos antigénicos liofilizados de proteínas solubles de almeja babosa (lote 1), fina (lote 2), italiana (lote 3) y rubia (lote 4).

Antes de comenzar el protocolo de inmunización, se extrajo una muestra de sangre a los conejos (S_0), y el suero obtenido se analizó mediante la técnica de ELISA indirecto frente a los extractos antigénicos de interés (PSB, PSF, PSI y PSR). Una vez comprobada la ausencia de reactividad de los sueros de los conejos frente a los extractos antigénicos de interés, los animales se consideraron aptos para su inmunización.

A lo largo del proceso de inmunización de los conejos, se comprobó mediante la realización de sangrías parciales, si éstos producían anticuerpos frente a las proteínas solubles de las especies de almejas objeto de estudio. En la sangría inicial, efectuada a los 20 días de la primera inoculación, se detectó una reacción inmunológica significativa de los inmunosueros frente a sus respectivos extractos antigénicos. En las sangrías parciales realizadas posteriormente, se apreció un incremento significativo de la respuesta inmunológica de los conejos frente a los extractos antigénicos de interés. Por ello, a las 16 semanas de iniciar el proceso de inmunización, se llevó a cabo la sangría final de los conejos (S_f).

Los inmunosueros procedentes de la sangría final (anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR), se purificaron parcialmente mediante precipitación con sulfato amónico al 50%, según se describe en el apartado III.3.2.4.

IV.2.2.1. VALORACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES Y DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PLACA PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE ALMEJAS

Mediante la técnica de ELISA indirecto, se determinó la capacidad de los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR, precipitados con sulfato amónico, para reconocer los extractos antigénicos de almeja babosa, fina, italiana y rubia (sección III.3.3.).

Las muestras de almejas utilizadas como antígenos, se prepararon como se describe en el apartado III.3.3., con el fin de obtener el extracto líquido de proteínas solubles que, una vez diluido en tampón PBS, se utilizó como antígeno en la técnica de ELISA indirecto. Los resultados obtenidos en experiencias preliminares, indicaron que la dilución más apropiada de los extractos antigénicos era la 1:200 en tampón PBS y la del conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con la enzima peroxidasa de rábano la de 1:2.000 en tampón PBSTM. Las diluciones óptimas de los anticuerpos precipitados con sulfato amónico fueron de 1:100 en tampón PBSTM para los anticuerpos anti-PSB, anti-PSI y anti-PSR, y 1:300 para los anticuerpos anti-PSF. Como sustrato para la peroxidasa se empleó el ABTS[®] (Roche).

En la *Tabla 22*, se puede observar la fuerte reactividad cruzada de todos los anticuerpos frente a los extractos antigénicos de las especies heterólogas, utilizando la técnica de ELISA indirecto. Por lo tanto, tales inmunosueros no se podrían utilizar para identificar las especies de almejas, a no ser que se sometieran previamente a un proceso de purificación.

Los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR, se hicieron específicos de especie mezclándolos con los extractos antigénicos de las especies heterólogas, es decir, se procedió a la neutralización de los anticuerpos productores de reacciones cruzadas mediante la técnica de inmunoadsorción.

Las concentraciones de los extractos antigénicos que permitieron eliminar las reacciones cruzadas de los inmunosueros se determinaron

experimentalmente como se describe en la sección III.3.2.5. Una vez neutralizados, los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF y anti-PSR reconocían únicamente el extracto antigénico frente al cual se habían producido. Se analizaron 20 individuos de cada una de las especies estudiadas, frente a los cuatro tipos de anticuerpos policlonales. La *Tabla 23* recoge los resultados obtenidos.

Tabla 22. Resultados del ELISA indirecto para el análisis de proteínas solubles de muestras de almejas, empleando los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR sin neutralizar.

Especie analizada	n	Absorbancia (405 nm) (M±DE)			
		Anti-PSB	Anti-PSF	Anti-PSI	Anti-PSR
<i>V. pullastra</i>	20	2,356 ± 0,205	1,756 ± 0,166	1,773 ± 0,125	1,675 ± 0,215
<i>R. decussatus</i>	20	1,792 ± 0,125	2,089 ± 0,207	1,892 ± 0,160	1,812 ± 0,156
<i>R. philippinarum</i>	20	1,983 ± 0,162	1,898 ± 0,218	2,286 ± 0,112	1,786 ± 0,112
<i>V. rhomboides</i>	20	1,826 ± 0,102	1,789 ± 0,118	1,868 ± 0,182	2,168 ± 0,212

(M)= Media.
(DE)= Desviación estándar.
(n)= Número de individuos analizados.
Valores de absorbancia de los controles negativos 0,080-0,200

Tabla 23. Resultados del ELISA indirecto para el análisis de proteínas solubles de muestras de almejas, empleando los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR neutralizados.

Especie analizada	n	Absorbancia (405 nm) (M±DE)			
		Anti-PSB	Anti-PSF	Anti-PSI	Anti-PSR
<i>V. pullastra</i>	20	0,807 ± 0,125	0,235 ± 0,066	0,574 ± 0,125	0,180 ± 0,035
<i>R. decussatus</i>	20	0,193 ± 0,034	1,021 ± 0,237	0,658 ± 0,160	0,244 ± 0,052
<i>R. philippinarum</i>	20	0,178 ± 0,022	0,197 ± 0,098	0,865 ± 0,092	0,159 ± 0,082
<i>V. rhomboides</i>	20	0,266 ± 0,080	0,210 ± 0,068	0,654 ± 0,182	0,950 ± 0,125

(M)= Media.
(DE)= Desviación estándar.
(n)= Número de individuos analizados.
Valores de absorbancia de los controles negativos 0,080-0,200

Como se puede apreciar en esta tabla, los valores de absorbancia de muestras heterólogas son similares a los valores de los controles negativos, excepto en la especie de almeja italiana, en la que los valores de absorbancia de las especies heterólogas son similares a los obtenidos en muestras de dicha especie. Las muestras de almeja babosa alcanzaron valores de absorbancia superiores a 1,0 con los anticuerpos anti-PSB, las de almeja fina valores superiores a 0,9 con el inmunosero anti-PSF y las de almeja rubia valores superiores a 0,8 con el suero anti-PSR. Sin embargo, no se pudieron obtener mediante neutralización anticuerpos policlonales que reconocieran únicamente a la especie de almeja italiana, puesto que los anticuerpos policlonales anti-PSI neutralizados reconocían también determinantes antigénicos de las otras tres especies heterólogas (almeja babosa, fina y rubia) (*Tabla 23*).

Los resultados obtenidos con la técnica de ELISA indirecto permitieron identificar de forma inequívoca las muestras de las especies de almejas babosa, fina y rubia.

IV.2.2.2. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE ALMEJAS

Las muestras de almeja babosa, fina y rubia analizadas por la técnica de ELISA indirecto en placa (sección III.3.3.), se analizaron también mediante la técnica de ELISA indirecto en paletas (sección III.3.4.). Las concentraciones de los reactivos empleados en esta técnica, fueron las mismas que en la técnica de ELISA indirecto, pero en este caso se empleó el sustrato TMB (Roche).

En la *Figura 80*, se muestran los resultados obtenidos al analizar muestras de almeja babosa, fina y rubia. El desarrollo de color azul, resultante de la degradación del sustrato TMB por la peroxidasa, permitió identificar visualmente la identidad biológica de las muestras. Existe una clara diferencia entre la intensidad de color desarrollada en las muestras positivas y la alcanzada por las muestras de especies heterólogas.

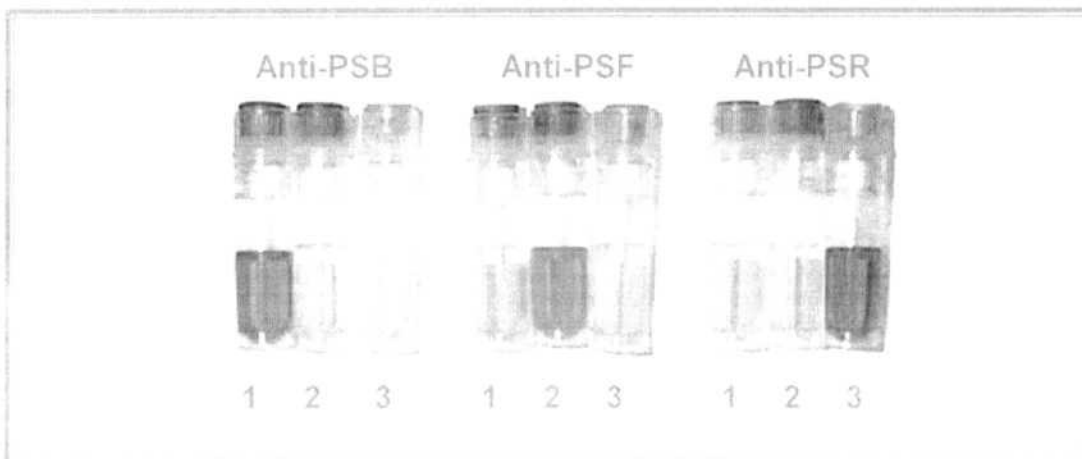


Figura 80. Resultados del ELISA en paletas para la identificación de muestras de almeja babosa (1), fina (2) y rubia (3), utilizando los anticuerpos anti-PSB, anti-PSF y anti-PSR neutralizados mediante la técnica de inmunoabsorción.

IV.2.3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DE ALMEJA FINA (*R. decussatus*)

Para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina, se inmunizaron 2 lotes de 4 ratones hembras de la estirpe Balb/c. El primer lote se inmunizó con extracto proteico liofilizado (PSF) y el segundo lote con extracto proteico sin liofilizar (PSF2). Las inoculaciones intraperitoneales se realizaron cada 2-3 semanas según se describe en el apartado III.3.5.1.

Antes de comenzar el protocolo de inmunización, se extrajo una muestra de sangre a los ratones (S_0), realizando un pequeño corte en la cola de los mismos, y el suero obtenido se analizó mediante la técnica de ELISA indirecto frente al extracto antigénico de almeja fina (PSF). Cuando se comprobó la ausencia de reactividad de los sueros de los ratones preinmunes frente al extracto antigénico de interés, los ratones se consideraron aptos para su inmunización.

Asimismo, a los 42 días de la primera inoculación, se realizó una sangría parcial de los ratones con el fin de comprobar si los animales producían anticuerpos frente a los extractos antigénicos de la almeja fina. Además, se comprobó la variabilidad de la respuesta inmunológica en cada animal inmunizado. Los inmunosueros de tres de los ratones de cada lote analizado, mostraron valores de absorbancia a 405 nm superiores a 2,5 y por consiguiente, se consideró que el título del suero era suficiente para proceder a la sangría final. A continuación, estos ratones se utilizaron para efectuar la fusión celular de los linfocitos del bazo con células de mieloma de ratón (P3×63-Ag8.653).

Se realizaron 6 fusiones celulares y, dos semanas después de cada fusión celular, cuando los hibridomas comenzaban a ser visibles en los pocillos, se procedió a la evaluación de la producción de anticuerpos monoclonales de interés mediante la técnica de ELISA indirecto. Con esta técnica, se identificaron los pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos que reconocían al extracto antigénico de almeja fina, seleccionándose los pocillos cuya absorbancia fue superior a 1,0. Los resultados obtenidos en el ELISA indirecto de las fusiones realizadas, demostraron que existía una media

de entre 12-25 pocillos positivos en cada fusión. A su vez, el sobrenadante de los pocillos seleccionados se analizó mediante ELISA indirecto de diferenciación, que consistió en comprobar la especificidad del sobrenadante de cada pocillo frente a los extractos antigénicos de la almeja fina. En este ELISA indirecto de diferenciación, se enfrentaron los extractos antigénicos líquidos de las cuatro especies de almejas: babosa (PSB2), fina (PSF2), italiana (PSI2) y rubia (PSR2), con el sobrenadante de cada uno de los pocillos seleccionados. Se consideraron pocillos productores de anticuerpos específicos frente a la almeja fina, aquellos cuya absorbancia a 405 nm fuera 1,0 o superior a las absorbancias obtenidas en las otras tres especies heterólogas, y las absorbancias frente a las especies de almejas babosa, italiana y rubia fueran similares a las de los controles negativos ($\leq 0,2$).

En todas las fusiones realizadas, el ELISA indirecto frente a la especie de almeja fina evidenció la presencia de anticuerpos frente a dicha especie, ya que se obtuvieron varios pocillos positivos. Sin embargo, cuando se realizó la técnica de ELISA indirecto de diferenciación, se observó que la mayoría de los pocillos positivos frente a la almeja fina lo eran también frente a alguna de las tres especies de almejas relacionadas filogenéticamente: babosa, italiana y rubia. Además, se realizó la diferenciación utilizando el formato de ELISA *sandwich*, pero no mejoraron los resultados. En consecuencia, las placas de fusión se desecharon debido a que no se detectó la presencia de anticuerpos específicos frente a la especie de almeja fina.

Capítulo V

DISCUSIÓN

V.1. IDENTIFICACIÓN DE ALMEJA BABOSA (*V. pullastra*), FINA (*R. decussatus*), ITALIANA (*R. philippinarum*) Y RUBIA (*V. rhomboides*) MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS

El desarrollo y puesta a punto de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han dado lugar a importantes avances en el control de la calidad en la industria alimentaria. Estas técnicas, debido a su especificidad, sensibilidad y rapidez son herramientas muy útiles para el estudio y caracterización de especies, poblaciones e individuos (Skibinski, 1994).

A pesar de requerir un mayor soporte técnico y ser más caras, las técnicas genéticas presentan importantes ventajas frente a las técnicas de análisis de proteínas (*Tabla 17*): (1) la molécula de ADN es más termoestable que muchas proteínas, con lo que el análisis de los ácidos nucleicos permite analizar muestras sometidas a tratamientos térmicos o conservadas en condiciones deficientes; (2) el ADN está presente en todas las células de los organismos, proporcionando resultados siempre idénticos para un mismo individuo, independientemente del tejido que se examine; (3) la cantidad de muestra necesaria para el análisis es mínima; (4) la molécula de ADN aporta mayor información que las proteínas, debido a que el código genético es degenerado y a la presencia de muchas regiones no codificantes (Lockley y Bardsley, 2000); y además, (5) el estudio del ADN permite detectar mutaciones que no determinan cambios en la secuencia aminoacídica (Ferguson y col., 1995).

La técnica de PCR, permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática a partir de ADN genómico total. Esta técnica, ha supuesto un profundo impacto en las técnicas de biología molecular y tiene un gran potencial como herramienta para la detección de polimorfismos, utilizándose en el diagnóstico de muchas enfermedades tanto humanas como de animales (Wu y col., 1989; Sritharan y Barker, 1991; Van Belkum y col., 1998), en el estudio del cáncer (Bos, 1989), en estudios de evolución molecular (Griffiths y Tavaré, 1994), en la detección de parásitos (Reithinger y col., 2000), en la detección de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Hill, 1996; Gutiérrez y col., 1998;

Scheu y col., 1999), en la conservación de especies (Haig, 1998), estudios forenses (Murray y col., 1995), y en la identificación de alimentos procedentes de organismos modificados genéticamente (Gachet y col., 1999; Spiegelhalter y col., 2001), entre otras muchas aplicaciones.

En la identificación de especies de moluscos, las técnicas de PCR se han centrado, como se indica en la introducción, en el análisis genético de poblaciones y en estudios filogenéticos. La técnica de PCR sin combinar con ninguna otra técnica tan sólo se ha empleado en dos trabajos sobre la identificación especies del mejillón *Mytilus* spp. (Inoue y col., 1995; Rawson y col., 1996). Por lo tanto, la identificación de especies de moluscos se ha llevado a cabo en la mayoría de los casos, mediante la combinación de la PCR con otras técnicas complementarias como la secuenciación (Geller y col., 1993; Rumbak y col., 1994; Canapa y col., 1996; 2000), el análisis de RFLP (Banks y col., 1993; Kenchington y col., 1993; Rawson y col., 1995; Toro, 1998), el análisis de SSCP (Li y Hedgecock, 1998), o el análisis del RAPD (Patwary y col., 1994; André y col., 1999).

En este trabajo de investigación, el objetivo consistió en la puesta a punto de técnicas de PCR que permitieran poner de manifiesto diferencias especie-específicas entre las secuencias de las especies de almejas de mayor interés comercial en España: babosa (*Venerupis pullastra*), fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*) y rubia (*Venerupis rhomboides*). Para llevar a cabo el objetivo propuesto fue necesario, en primer lugar, poner a punto un método que permitiera extraer de las muestras de almejas el ADN y ARN íntegros, libres de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa. A continuación, se seleccionaron fragmentos génicos con un grado de variabilidad genética intra- e interespecífica adecuado para la diferenciación de las especies objeto de análisis. Finalmente, una vez analizadas las secuencias obtenidas se pusieron a punto técnicas sencillas que permitieran poner de manifiesto diferencias especie-específicas entre los fragmentos amplificados y que pudieran utilizarse para la identificación específica de muestras de identidad desconocida.

V.1.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

V.1.1.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

Para llevar a cabo la identificación genética de las especies de almejas objeto de estudio, es necesario extraer de la muestra una cantidad suficiente del ADN de buena calidad. La calidad del ADN extraído está determinada tanto por su tamaño molecular como por su grado de pureza, y éstos parámetros son los que van a condicionar los resultados de la reacción de amplificación (Golenberg y col., 1996).

El principal problema que se presenta en la aplicación de técnicas genéticas para estudios moleculares del filo Moluscos es la dificultad de extraer ADN de alto peso molecular y libre de compuestos inhibidores que impiden la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Chapman y Brown, 1990; Wilson, 1997). Esto es debido a que los moluscos secretan mucopolisacáridos (Grenon y Walker, 1981; Borgo y col., 1996) y proteínas polifenólicas (Rzepecki y Waite, 1993), que se pueden extraer junto con el ADN e interfieren en la amplificación de los fragmentos génicos. La presencia de determinadas impurezas puede reducir, e incluso inhibir, la sensibilidad y eficacia de la reacción de PCR (Kreader, 1996). Se han realizado varios estudios sobre la influencia de determinados componentes presentes en muestras clínicas (Panaccio y Lew, 1991) y varios detergentes (Weyant y col., 1990). En alimentos, se ha investigado también la influencia de algunos de sus componentes y de los reactivos empleados en la extracción de ácidos nucleicos sobre la amplificación de fragmentos génicos (Rossen y col., 1992; Löffert y col., 1997). En este sentido, se ha demostrado que el detergente SDS empleado en muchos métodos de extracción del ADN en la fase de lisis celular, puede inhibir totalmente la PCR cuando se encuentra en una concentración del 0,01%, pero a concentraciones del 0,005% no inhibe la reacción de amplificación. De un modo similar, el fenol utilizado para separar las proteínas de las muestras, inhibe la reacción de amplificación si se encuentra a concentraciones del 0,5%, y no la inhibe si se encuentra a concentraciones del 0,1%. Alcoholes como etanol, cloroformo y polietilenglicol (PEG) precipitan el ADN e incluso a ciertas concentraciones pueden inhibir también la PCR. Los detergentes iónicos empleados en la extracción inhiben la PCR en mayor

medida que los aniónicos (Weyant y col., 1990). Así por ejemplo, el EDTA y EGTA [etilenglicol-bis(2-aminoetil)-tetraacético] inhiben la PCR a concentraciones de 1 mM, aunque sólo el EDTA quela los iones magnesio necesarios para la actividad enzimática de la polimerasa. El hidróxido sódico inhibe la reacción de amplificación a concentraciones de 8mM, debido a que el pH creado puede provocar la desnaturalización de la polimerasa y de la doble cadena del ADN.

En otro estudio sobre la inhibición de la PCR (Wilson, 1997), se llegó a la conclusión de que ésta también puede ser consecuencia de una lisis insuficiente de las muestras, desnaturalización de la polimerasa, degradación o precipitación del ADN diana, quelación de los iones magnesio requeridos en la reacción y de la presencia de sustancias inhibidoras presentes en el alimento (compuestos fenólicos, ácidos grasos, calcio, glucógeno, etc.). Además, pueden interferir también en la amplificación contaminantes como el polvo de los guantes utilizados por el analista, polen presente en el aire, el plástico del material empleado, etc.

La calidad del ADN también está estrechamente relacionada con el tamaño molecular de los fragmentos del ADN obtenidos, expresado en pares de bases de nucleótidos. A temperaturas bajas (4°C o inferiores), el ADN tiende a ser muy estable (Cerdeira y Koppen, 1998). Sin embargo, el ADN se puede degradar durante los tratamientos térmicos como la esterilización, reduciéndose a fragmentos de 500 pb o incluso menores (Chikuni y col., 1990; Unseld y col., 1995). Así por ejemplo, en carne tratada térmicamente (esterilización) el tamaño de los fragmentos obtenidos es de una media de 300 pb (Ebbehøj y Thomsen, 1991). Sin embargo, aunque el tratamiento térmico limita la eficacia de la reacción de PCR, se pueden amplificar fragmentos de ADN específicos de especie a partir de muestras con ADN degradado. Unseld y col. (1995) amplificaron un fragmento de 123 pb a partir de ADN de distintas especies de tiburidos enlatados, aunque no pudieron amplificar a partir del ADN de las mismas muestras un fragmento de 402 pb. Del mismo modo, Quinteiro y col. (1998), consiguieron amplificar un fragmento de 126 pb, pero fracasaron en la amplificación de un fragmento de 299 pb. Además, tanto los tratamientos térmicos como los tratamientos con reactivos ácidos pueden dar lugar a una

depuración del ADN, impidiendo su amplificación por PCR (Bossier, 1999). Marguet y Forterre (1998), comprobaron que la depuración del ADN a altas temperaturas (100°C) se inhibía con cloruro potásico y cloruro magnésico, mientras que la fragmentación del ADN se estimulaba con cloruro magnésico.

Por lo tanto, en los productos marinos existe una gran variedad de factores que determinan el tamaño del ADN extraído, así como su susceptibilidad para ser amplificado por PCR. En este trabajo, se estudió la integridad del ADN extraído a partir de muestras de almejas, comparando el tamaño de las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa. El grado de pureza se evaluó mediante espectrofotometría de absorción, empleando las relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ y $A_{230\text{nm}/260\text{nm}}$. Además de tener en cuenta la degradación del ADN y la presencia de posibles inhibidores de la reacción de PCR, hay que considerar que la amplificación de fragmentos génicos por PCR depende también de que los reactivos de la mezcla se encuentren en proporciones adecuadas, así como del diseño de cebadores que hibriden adecuadamente en especies cuyas secuencias del ADN se desconocen.

De lo expuesto anteriormente se puede concluir que uno de los factores más importantes que van a determinar que la técnica de PCR se extienda con mayor o menor rapidez en el análisis de los alimentos es la puesta a punto de un protocolo de extracción del ADN a partir de los alimentos, que proporcione ADN de buena calidad y libre de sustancias inhibitoras (Wilson, 1997). El mayor reto sería conseguir un método que fuera rápido, sencillo de llevar a cabo y que proporcionara buenos resultados con cualquier tipo de alimento.

Los métodos clásicos de extracción del ADN comprenden una fase inicial de digestión de la muestra con detergentes, proteasas y en algunos casos ARN-asas, seguida de la separación de proteínas y polisacáridos con disolventes orgánicos (fenol y cloroformo) y finalmente, la precipitación del ADN presente en la fase acuosa con un alcohol (etanol o isopropanol) (Sambrook y col., 1989). Como sustitución de estos métodos, generalmente laboriosos, las empresas de biotecnología han diseñado *kits* comerciales basados en el empleo de resinas comerciales que aíslan el ADN de muestras complejas, o en la utilización de elevadas concentraciones de agentes caotrópicos, como el

isotiocianato de guanidina (GuSCN), que unen los ácidos nucleicos a partículas de diatomeas o de sílice (Boom y col., 1990).

En este trabajo se evaluó el potencial de varios métodos de extracción del ADN a partir de muestras de almejas para su utilización en las técnicas de PCR (sección III.2.3.1.).

De los resultados obtenidos con los distintos protocolos de extracción estudiados en este trabajo, el método tradicional propuesto por Bagshaw (1991), y el kit comercial *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food*, dieron lugar a ADN de alto grado de pureza e integridad, que permitió la amplificación de los fragmentos génicos de interés. El método clásico descrito por Bagshaw en 1991, fue diseñado para la extracción del ADN genómico a partir de muestras de crustáceos. Este método se basa, al igual que todos los métodos clásicos, en una lisis tisular con detergentes y proteinasa K en un medio tamponado (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 0,1 M; EDTA 0,1 M; SDS 0,5%), seguido de una primera separación de proteínas y azúcares con disolventes orgánicos y una precipitación del ADN con etanol. Posteriormente, se procede a una segunda separación de las proteínas y azúcares y a una segunda precipitación del ADN. La primera separación de las proteínas con fenol durante toda la noche, y la segunda separación de las mismas, parecen tener una repercusión importante para la obtención del ADN de suficiente calidad, libre de proteínas y polisacáridos presentes en los tejidos de los moluscos y que son inhibidores de la PCR. Una vez transcurrida la lisis del tejido muscular y la primera separación de proteínas y azúcares, la extracción del ADN celular total se realizó en 5 h. Este método proporcionó un elevado rendimiento, pureza e integridad del ADN (*Figura 49*). Además, en todas las muestras de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, se amplificó el fragmento de 521 pb del gen α -actina utilizado como control de amplificación.

Con el kit comercial *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food*, se obtuvo también ADN de suficiente calidad para el análisis genético con los marcadores elegidos. Este protocolo se basa en la utilización de partículas paramagnéticas que se unen a los ácidos nucleicos en solución. En primer lugar, se produce una lisis de la muestra en presencia de enzimas ARNasas, para posteriormente realizar una segunda lisis y una precipitación de los ácidos

nucleicos. A continuación, el lisado se mezcla en un tubo de microcentrífuga con las partículas *MagneSil™ PMPs*, para capturar el ADN, y las partículas magnéticas unidas al ADN se separan del resto de la muestra por medio de un imán. Las partículas se lavan tres veces con etanol y se eluye el ADN unido a las mismas con un tampón de baja fuerza iónica. El sobrenadante, obtenido en menos de 2 h, contenía el ADN de las muestras de almejas. Aunque el rendimiento de ADN obtenido con este kit fue menor que el obtenido con el método clásico de Bagshaw (1991), el grado de pureza e integridad fueron adecuados y permitieron la amplificación de los fragmentos seleccionados (*Figura 50*). Las principales ventajas de este método de extracción son su rapidez, comodidad de uso para varias muestras simultáneamente y la obtención del ADN de buena calidad sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos. Sin embargo, su mayor inconveniente es el precio por muestra, muy superior al de los métodos clásicos como el de Bagshaw (1991).

El método propuesto por DeSalle y col. (1993) para la extracción del ADN genómico animal comprende 4 fases: digestión de la muestra con el tampón de lisis TSM (Tris 0,2 M; EDTA 0,1 M; SDS 1%) y proteinasa K, purificación del ADN con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y una doble precipitación del ADN con etanol. La segunda precipitación del ADN, parece tener importantes repercusiones en la calidad final de los ácidos nucleicos obtenidos. Este método de extracción se había utilizado previamente en nuestro equipo de investigación para extraer ADN de muestras de pescado (Carrera y col., 1999a, 1999b; Céspedes y col., 1998; 1999a) y había proporcionado excelentes resultados. Sin embargo, al aplicarlo a muestras de almejas se obtuvo ADN de elevado tamaño molecular (*Figura 44*), pero las relaciones de absorbancia $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ fueron superiores a 0,7, lo que indujo a pensar que se habían extraído sales junto con el ADN obtenido a partir de las muestras de almejas. Además, no se consiguió amplificar el fragmento de 521 pb en ninguna de las muestras, lo que indica la presencia de inhibidores de la PCR.

El método de extracción del ADN mitocondrial descrito por Borgo y col. (1996), para la identificación genética mediante PCR-RFLP de dos especies de caracol, no dio buenos resultados con las muestras de almejas. Este método

clásico, se basa en una lisis con tampón TEK (Tris-HCl 0,1 M; EDTA 0,02 M; KCl 1,5%, pH 7,8) y proteinasa K, seguida de lisis de las mitocondrias con SDS alcalino (NaOH 0,2 M; SDS 1%), una triple extracción del ADN con fenol saturado en agua y cloroformo-isoamiloalcohol, y finalmente, una doble precipitación del ADN con isopropanol y acetato potásico. Las muestras presentaron una elevada proporción de proteínas y sales ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1,6-1,7 y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ superiores a 0,7), los ADNs aparecieron degradados (*Figura 45*) y no fue posible amplificar el fragmento del gen α -actina.

Los resultados obtenidos con el protocolo de extracción de Jones y col. (1993), diseñado para el aislamiento de microorganismos a partir de ostras, tampoco dio buenos resultados con las muestras de almejas. Este método combina la capacidad del isotiocianato de guanidina (GuSCN) para romper células e inactivar nucleasas, con la capacidad de extracción del cloroformo. Sin embargo, la pureza del ADN obtenido a partir de muestras de almejas era deficiente, los ADNs estaban bastante degradados (*Figura 46*), y no permitieron amplificar por PCR los fragmentos de ADN seleccionados.

El método de extracción del ADN diseñado por Patwary y col. (1996), para la caracterización del gen que codifica la proteína muscular actina en la especie de vieira *Placopecten magellanicus*, tampoco dio resultados satisfactorios con muestras de almejas. Este método consistió en un lavado previo de las muestras con tampón PBS (como en el método de Jones y col., 1993), para posteriormente realizar un lisado del tejido muscular con tampón de lisis (sarcosil 2%; NaEDTA 0,5 M; NaCl 0,1 M; Tris 0,02 M, pH 7,6) que contenía proteinasa K, y una precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol frío. Posteriormente, éstos se resuspendieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM) y se procedió a una doble extracción del ADN con el tampón [fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); Tris 0,1 M pH 7,5; β -mercaptoetanol 0,2%]. Finalmente, se procedió a una segunda extracción con cloroformo-isoamiloalcohol y una precipitación con acetato amónico y etanol frío. En nuestro caso las relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ fueron menores de 1,6 y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ fueron superiores a 0,7, los ADNs aparecieron bastante degradados (*Figura 47*) y no se consiguió amplificar ningún fragmento a partir de las muestras de almejas estudiadas.

Finalmente, se utilizó también el kit comercial de extracción del ADN a partir de tejidos *QIAamp tissue kit*, el cual, a pesar de ser un método rápido de extracción de ADN, dio lugar a la obtención de ADNs bastante degradados (*Figura 48*), con los que no se amplificó el fragmento de 521 pb del gen α -actina en ninguna de las muestras de almejas.

V.1.1.2. EXTRACCIÓN DEL ARN

Para la obtención del ARN y ARNm de buena calidad, es necesario minimizar la actividad de las enzimas ARNasas liberadas durante la lisis celular, empleando inhibidores de estas enzimas o métodos en los que simultáneamente se produce la ruptura de las células e inhibición de las ARNasas. También, se debe evitar la introducción accidental de pequeñas cantidades de enzimas ARNasas procedentes de otras fuentes presentes en el laboratorio. Al igual que con las muestras de ADN, es importante determinar la integridad y grado de pureza del ARN extraído. La integridad del ARN, se determinó visualizando el ARN extraído de cada muestra en un gel de agarosa, en el que se deben observar dos bandas: una banda alta que corresponde al ARN ribosomal 28S y una banda baja que corresponde al ARN ribosomal 18S. Para determinar el grado de pureza del ARN, se diluyó el ARN extraído en agua tratada con DEPC y se determinaron los valores de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Ésta relación deberá estar comprendida entre 1,5-1,9, ya que si existe contaminación con proteínas o fenol, la relación será significativamente menor.

En este trabajo, para la obtención del ARN total a partir de muestras de las especies de almejas objeto de estudio, se utilizaron dos kits comerciales: *ULTRASPEC™ RNA Isolation System* (Biotecx) y *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Ambos métodos permitieron la extracción del ARN en menos de 1 h. Además, con ambos métodos de extracción las relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ estuvieron comprendidas entre 1,5-1,9 y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ entre 0,3-0,7. La integridad del ARN extraído fue adecuada con ambos métodos (*Figuras 51 y 52*), aunque con el método de extracción *ULTRASPEC™ RNA Isolation System* se obtuvo un mejor rendimiento (600-1.000 ng/ μL del ARN total) que con el *RNeasy Mini Kit* (100-300 ng/ μL). En algunos casos, es posible el aislamiento

del ADN o proteínas junto con el ARN total, por lo que se utilizó el kit *Oligotex mRNA Batch protocol* (Qiagen) (ver sección III.2.5.1.) para la obtención del ARNm a partir del ARN de las muestras de almejas.

V.1.2. SELECCIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Para elegir los marcadores genéticos que se van a emplear en la identificación de especies, es importante considerar una serie de premisas: (1) las regiones de ADN seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad adecuada para que especies estrechamente relacionadas tengan secuencias de nucleótidos diferentes, pero suficientemente lenta como para que esas diferencias no aparezcan dentro de la misma especie (Hall y Nawrocki, 1995; Hansen y Loechcke, 1996); (2) la longitud del fragmento amplificado debe ser suficiente para detectar diferencias interespecíficas, pero conviene que no sea superior a la longitud que se puede secuenciar en un gel de secuenciación estándar; (3) son preferibles regiones de ADN que codifiquen proteínas, ya que los errores en la secuenciación y/o amplificación pueden detectarse comparándolos con la secuencia de aminoácidos correspondiente; y (4) hay que tener en cuenta que la creación de bases de datos es un proceso largo, por lo que es aconsejable trabajar con genes cuya secuencia haya sido determinada en diversos organismos (Bartlett y Davidson, 1992), en nuestro caso en otras especies de moluscos.

El genoma mitocondrial ha sido el más utilizado en la diferenciación genética de especies de pescado y marisco. Esto es debido a que se trata de un ADN haploide y no recombinante, es mucho más pequeño que el ADN nuclear (16-17 Kb), cada célula posee miles de copias, no posee intrones, apenas hay espacios intergénicos y además, tiene una tasa de evolución de 5-10 veces mayor que el ADN nuclear (Meyer, 1993; Borgo y col., 1996). Asimismo, puede detectar diferencias geográficas y aportar datos sobre los agentes que influyen en la diferenciación genética de las poblaciones (Avise y col., 1987). Estas características representan una importante ventaja frente a la utilización de marcadores nucleares, principalmente cuando se analizan productos sometidos a tratamientos tecnológicos que dificultan la obtención de ADN de elevado tamaño molecular (Quinteiro y col., 1998). No obstante, la utilización de marcadores nucleares también tiene interés, porque permite

analizar regiones no codificantes del genoma con un alto grado de polimorfismo (O'Reilly y Wright, 1995). Por otro lado, la presencia de intrones de longitud y secuencia variable intercalados en los genes que codifican diversas proteínas, permite amplificar fragmentos génicos cuya longitud es específica de especie (Gross y col., 1996).

El nivel de polimorfismo de cada marcador genético condiciona su posible aplicación para el estudio de relaciones filogenéticas entre especies, poblaciones o individuos de una misma especie. De este modo, en los estudios de variabilidad genética de poblaciones de pescados y mariscos, se han utilizado preferentemente zonas que presentan un alto nivel de polimorfismo, como los intrones del gen muscular que codifica la proteína actina (Ohresser y col., 1997; Daguin y Borsa, 1999), las subunidades del gen mitocondrial citocromo oxidasa c (Saavedra y col., 1996; Boudry y col., 1998; Foighil y col., 1998; King y col., 1999), zonas de gran tamaño (0,5-2 Kb) que engloban varios genes de secuencias más conservadas (Rawson y Hilbish, 1995; Sajdak y Phillips, 1997) o la enzima malato deshidrogenasa (Kirby, 2000).

En estudios de identificación de especies se han seleccionado, por el contrario, zonas más conservadas y fragmentos más pequeños. El gen que más se ha utilizado para la identificación de especies ha sido el gen que codifica la proteína citocromo b (Bartlett y Davidson, 1992; Ram y col., 1996; Céspedes y col., 1998; Carrera y col., 1998; Russell y col., 2000; Partis y col., 2000). Pero también se han empleado con el mismo fin otros fragmentos del genoma mitocondrial como los genes 12S (Borgo y col., 1996) y 16S (Geller y col., 1993; Rumbak y col., 1994; Foighil y col., 1995; Canapa y col., 1996; Canapa y col., 2000), y marcadores nucleares, como los genes que codifican la subunidad 18S del ARNr (Kenchington y col., 1993; Rice y col., 1993; Kenchington y col., 1995; Steiner y Müller., 1996; Canapa y col., 1999), la subunidad 28S del ARNr (Hara y col., 1994; Silberman y Walsh, 1992) o la proteína α -actina (Watabe y col., 1995).

Por lo tanto, para la realización de este trabajo se consideró conveniente la selección de genes con regiones conservadas, con el fin de amplificar el mismo fragmento en todas las especies objeto de análisis. Tras realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva y comparar las secuencias de pescados y

moluscos disponibles en las bases de datos *GenBank* y *EMBL*, se eligieron tres genes nucleares, el gen que codifica la proteína α -actina, la región que engloba los dos espaciadores internos de la transcripción (ITS-1 e ITS-2) y el gen que codifica la enzima arginina quinasa, así como el gen mitocondrial 16S ARNr. Seguidamente, se procedió a la selección de los cebadores para su amplificación.

V.1.3. DISEÑO DE LOS CEBADORES

El éxito o fracaso de la amplificación por PCR de un fragmento génico depende, en gran medida, del diseño de cebadores específicos. El diseño de cebadores puede ser relativamente sencillo si se conoce la secuencia que se desea amplificar y se respetan unas normas básicas (Sambrook y col., 1989). Se pueden utilizar cebadores *universales*, es decir, que hibridan en regiones conservadas de las secuencias génicas en una gran variedad de especies (Kocher y col., 1989) o, por el contrario, cebadores *especie-específicos*, que hibridan selectivamente en las secuencias diana de una especie y no en otras relacionadas, con las que difieren al menos en algún nucleótido (Ugozzoli y Wallace, 1991; Matsunaga y col., 1999). También se pueden utilizar cebadores *degenerados*, en los que se introducen inosinas o una mezcla de nucleótidos en alguna posición del cebador cuya secuencia diana se desconoce. Estos cebadores, hacen posible la amplificación de productos de PCR en especies estrechamente relacionadas cuyas secuencias nucleotídicas son distintas y también permiten amplificar regiones de las que sólo se conoce la secuencia aminoacídica (Kwok y col., 1994).

En cualquier caso, se deben elegir, dentro de lo posible, cebadores con una longitud comprendida entre 18-30 nucleótidos, y con un porcentaje de guanina y citosina en torno al 50% (ya que los enlaces G=C son más estables que los A=T). Los enlaces G=C, facilitan la hibridación con las secuencias diana a temperaturas relativamente altas, impidiendo uniones inespecíficas. Además, la temperatura de hibridación (T_a) de los cebadores con la secuencia diana debe ser similar. Así mismo, se debe evitar que los cebadores sean complementarios entre sí, especialmente en su extremo 3', para evitar la formación y amplificación de dímeros que reducen la eficacia de la reacción (Saiki, 1989). Finalmente, el número de bases no complementarias entre el

cebador y la secuencia diana ha de reducirse al mínimo, principalmente en el extremo 3' del cebador, donde comienza la elongación del ADN copia generada por la polimerasa.

Cuando se han diseñado los cebadores, es necesario confrontar su secuencia con las bases de datos de ácidos nucleicos (Genbank, EMBL) con el fin de identificar secuencias afines. De esta manera, aumenta la especificidad del análisis al evitar que los cebadores diseñados compartan homologías con secuencias de genes o especies distintas a las que se pretende identificar.

En este trabajo, la elección de los cebadores empleados se realizó en base a la bibliografía existente sobre la amplificación de dichos genes (gen α -actina, espaciador interno de la transcripción, 16S ARNr y arginina quinasa). Además, para el diseño de cebadores se utilizaron programas informáticos como AMPLIFY (Engels, 1992) y PRIME (GCG, Universidad de Wisconsin, Madison, EE.UU.).

Gen α -actina

La α -actina es una de las proteínas musculares esqueléticas más importantes junto con la miosina, y está implicada en la regulación de la contracción y relajación del músculo a través del calcio, mediado a su vez por la interacción de proteínas reguladoras como la troponina y la tropomiosina (Ebashi y Endo, 1968). En las bases de datos, están disponibles las secuencias nucleotídicas de este gen para varias especies, como el hombre (Taylor y col., 1988), ratón (Hu y col., 1986), rata (Zakut y col., 1982), pollo (Fornwald y col., 1982) y vieira (Patwary y col., 1996). Los cebadores empleados para la amplificación de un fragmento de 521 pb del gen α -actina en las especies de almejas objeto de estudio, fueron diseñados por Watabe y col. en 1995. Estos autores, diseñaron dos parejas de cebadores para la secuenciación del ADNc que codifica dicha proteína en las especies de pescado carpa (*Cyprinus carpio*) y carpín (*Carassius auratus*), basándose en regiones conservadas de las secuencias de la α -actina en humanos, pollo, rata y ratón. La secuencia del ADNc de este gen tiene una longitud de 1.260 pb en carpa y 1.307 pb en carpín. En concreto, en este trabajo se utilizaron los cebadores act-2 y act-4,

que amplifican un fragmento de 521 pb que codifica una secuencia aminoacídica de 173 aminoácidos cerca del extremo C-terminal.

Una vez secuenciados los productos de PCR en las especies de almejas objeto de estudio obtenidos con la pareja de oligonucleótidos act-2 y act-4, se diseñó la pareja de cebadores act-5 y act-6 a partir de las regiones conservadas del fragmento amplificado previamente, que permitieron completar la identificación genética de las especies de interés (*Figura 54*).

Espaciador interno de la transcripción (ITS)

En los organismos eucariotas superiores, el ADN ribosómico se organiza en dos clases distintas de genes, los ARNs ribosómicos mayores (18S, 5,8S y 28S) y un grupo de genes ribosómicos menores (5S ADN_r). El primer grupo suele estar codificado en un gen que se repite un gran número de veces consecutivas y está constituido por las regiones codificadoras (18S, 5,8S y 28S), los espaciadores de la transcripción (internos: ITS-1 e ITS-2, y externos 5' ETS y 3' ETS), y la región espaciadora intergénica (IGS) (*Figura 28*). Estudios del ADN_r en poblaciones de animales y plantas, han mostrado que las regiones codificadoras son conservadas, mientras que los espacios intergénicos son variables (Gerbi, 1985). En este trabajo, se emplearon los cebadores ITS-1 e ITS-2, diseñados por Heath y col. (1995), a partir de secuencias de regiones codificadoras de los genes del ADN_r 18S y 28S en varias especies de eucariotas (Qu y col., 1988). Estos cebadores permiten la amplificación de un fragmento génico que incluye el primer espaciador interno de la transcripción (ITS-1), situado entre los genes ribosómicos 18S y 5,8S, la región conservada 5,8S y el segundo espaciador interno de la transcripción (ITS-2), situado entre los genes 5,8S y 28S (*Figura 28*). Heath y col. (1995) diseñaron los cebadores ITS-1 e ITS-2 para amplificar un fragmento de 1.250 pb aproximadamente en las especies de mejillón *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. Toro (1998), también utilizó estos mismos cebadores para la identificación genética de la especie de mejillón *Mytilus chilensis*.

Gen 16S ADNr

El ADN mitocondrial posee dos genes que codifican subunidades de ARN ribosómico, uno de la subunidad pequeña del ribosoma (12S ARNr) y otro de la subunidad grande (16S ARNr). En este trabajo, se emplearon los cebadores 16SAR y 16SBR, diseñados por Palumbi y col. (1991) a partir de regiones conservadas del gen mitocondrial 16S. Esta pareja de cebadores se ha utilizado para el estudio de las relaciones filogenéticas de especies de moluscos pertenecientes a las familias Venéridos (Canapa y col., 1996) y Pectínidos (Canapa y col., 2000). Asimismo se ha empleado para el estudio genético de poblaciones de las especies de mejillón *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, siendo la longitud del fragmento amplificado 527 pb (Rawson y Hilbish, 1995; 1998).

Gen arginina quinasa

La enzima arginina quinasa (AK), está ampliamente distribuida en los invertebrados y su secuencia se ha utilizado en estudios filogenéticos de especies de moluscos, uno de los grupos más diversos dentro del reino animal. Suzuki y Furukohri, (1994) diseñaron el cebador AKrna a partir de las secuencias de ADNc de una región conservada de las enzimas fosfagen quinasa en varias especies de vertebrados e invertebrados. Para el diseño de este cebador *universal*, emplearon la región situada entre las posiciones 272 a 279 del ADNc de dichas enzimas (West y col., 1984; Perryman y col., 1986). Esta región está basada en la secuencia aminoacídica Val-Trp-Val/Ile-Asn-Glu-Glu-Asp-His, la cual está muy conservada tanto en vertebrados como en invertebrados.

Para el diseño del cebador AKom, se buscaron secuencias del gen arginina quinasa de moluscos en las bases de datos *GenBank* y *EMBL* y se utilizaron los criterios básicos de diseño de cebadores y los programas informáticos PRIME y AMPLIFY. Tras la secuenciación del fragmento de 300 pb del gen que codifica la enzima arginina quinasa en las especies de almejas objeto de estudio, se diseñó el cebador AKalm, utilizando los programas PRIME, AMPLIFY y PILEUP indicados anteriormente. El cebador oligo-dT-adaptor, fue diseñado por Suzuki y Furukohri (1994), para obtener la secuencia

del extremo 3' del gen que codifica las enzimas fosfagen quinasas en invertebrados (Suzuki y Furukohri, 1994; Suzuki y col., 1997b; Suzuki y col., 1998, Suzuki y col., 1999).

V.1.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR

Existen numerosos factores que determinan el éxito o fracaso en la amplificación de un determinado fragmento génico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Uno de los más importantes es la calidad del ADN de partida, comentado en la sección V.1.1.1. Si éste posee impurezas, como agentes quelantes, detergentes o metales pesados (especialmente iones Fe^{2+} y Fe^{3+}), deben ser eliminados o diluidos hasta concentraciones en las que no inhiban la amplificación por PCR del ADN. Además, es preciso poner a punto la concentración óptima de cada componente de la reacción: MgCl_2 , cebadores, enzima ADN polimerasa y dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato).

Cloruro Magnésico

La reacción de PCR requiere iones divalentes como el magnesio Mg^{2+} , debido a que la concentración de este ión afecta a la unión de los cebadores, a la temperatura en la que se desnaturaliza el ADN y a la actividad enzimática, condicionando la exactitud a la hora de copiar la cadena molde de ADN. Elevadas concentraciones de Mg^{2+} pueden facilitar la formación de dímeros entre los cebadores, la unión de los cebadores a zonas inespecíficas del ADN o incluso dificultar la desnaturalización del ADN. Por este motivo, conviene utilizar varias concentraciones, generalmente en el intervalo de 1,5 a 4,0 mM, para mejorar la especificidad y poner a punto la concentración que proporciona mejores resultados en la amplificación de los productos de PCR (Oste, 1989). Hay que tener en cuenta también, la presencia de agentes quelantes como el EDTA junto con las muestras de ADN, ya que en estos casos la concentración real de magnesio es inferior.

Cebadores

Al igual que la concentración de MgCl_2 , se debe poner a punto la concentración de los cebadores. Se recomienda que la concentración de éstos esté comprendida entre 0,1 a 0,5 μM , debido a que altas concentraciones de los oligonucleótidos pueden dar lugar a la formación de dímeros entre ellos,

disminuyendo el rendimiento de la PCR (Brownie y col., 1997). Por este motivo, se debe evitar que entre los cebadores haya secuencias palindrómicas, así como que en sus extremos 3' tengan tres o más G o C. Para obtener resultados óptimos, se deben purificar los cebadores después de su síntesis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o mediante electroforesis en gel.

Enzima ADN polimerasa

La concentración recomendada de ADN polimerasa por cada reacción de 50 μ L está entre 0,5-2,5 U de enzima. Si la concentración de enzima es demasiado alta, puede dar lugar a la formación de productos de PCR inespecíficos. Asimismo, si la concentración es demasiado baja, disminuye el rendimiento de la reacción de PCR. Además, es necesario tener en cuenta los distintos comportamientos y especificidades de las enzimas ADN polimerasas disponibles comercialmente, con lo que se deberá ajustar en cada caso la concentración de la enzima.

Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

La concentración de dNTPs para la reacción de PCR suele estar comprendida entre 20-200 μ M para cada desoxirribonucleótido (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). Estos cuatro dNTPs deben emplearse en concentraciones equivalentes con el fin de minimizar errores en su incorporación. Si la concentración final de dNTPs en la reacción de PCR es mayor de 50 mM se puede inhibir la actividad de la ADN polimerasa (Innis y col., 1988).

Conviene señalar que los reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa son muy sensibles a los ciclos sucesivos de congelación-descongelación. Por lo tanto, es conveniente distribuirlos en alícuotas y almacenarlos a -20°C , conservando a 4°C las alícuotas que se van a emplear en el momento.

Hasta ahora, se han indicado las recomendaciones que ayudan a aumentar la especificidad y sensibilidad de la reacción de PCR, es decir, a evitar la existencia de falsos negativos. No obstante, también se pueden encontrar falsos positivos o contaminaciones de la muestra inicial, que pueden tener serias consecuencias puesto que se van a amplificar junto con el ADN de

interés. En general, se deben tomar medidas preventivas como la distribución en alícuotas de los reactivos, esterilizar el material y las soluciones que se van a emplear, la utilización de guantes y pipetas exclusivamente para llevar a cabo la mezcla de los reactivos, emplear puntas con filtro, y separar físicamente la zona en la que se preparan las reacciones de PCR y la zona en la que se encuentran los productos de PCR a analizar (Kwok y Higuchi, 1989).

Para el análisis del ARN es necesario, además de las medidas citadas anteriormente, emplear en todas las soluciones agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), y las cubetas para electroforesis deben estar también tratadas con DEPC (Sambrook y col., 1989). Todo el material que se emplea para el análisis del ARN se trata con cloroformo y se esteriliza en autoclave.

Finalmente, a pesar de respetar rigurosamente todas estas recomendaciones, es necesario incluir en toda reacción de PCR un control negativo en el que no se incluye ADN, con el fin de garantizar la ausencia de contaminación en las muestras amplificadas.

En este trabajo se tuvieron en cuenta todas las recomendaciones enumeradas, con el fin de optimizar la amplificación de los fragmentos génicos seleccionados. Las concentraciones óptimas de cada reactivo para la amplificación por PCR de los distintos segmentos de ADN estudiados, se describen en la sección III.2.6.

V.1.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se pueden clonar en un vector antes de la secuenciación, o bien se pueden secuenciar directamente. No obstante, antes de llevar a cabo la secuenciación de los productos de PCR conviene eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y sales de la reacción de amplificación (Thomas y Kocher, 1993). En este trabajo, los productos de PCR generados tras la amplificación con los cebadores seleccionados se purificaron con el kit *Qiaquick Gel Extraction Kit*, con el que se eliminaron los cebadores, así como cualquier sustancia que pudiera interferir en la reacción de secuenciación.

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados con las parejas de cebadores ITS-1/ITS-2 y oligo-dT-adaptor/AKalm, éstos se clonaron en un

vector utilizando el kit comercial pGEM[®]-T Easy Vector System II (Promega) y, posteriormente, se secuenciaron con los cebadores del vector M13F y M13R. Sin embargo, para la secuenciación de productos de PCR cuya longitud era menor de 600 pb, como los fragmentos generados con las parejas de cebadores act-2/act-4, 16SAR/16SBR y AKom/AKrna, se purificaron y secuenciaron directamente en ambas direcciones con dichas parejas de oligonucleótidos.

La secuenciación de los productos de PCR tiene por objetivo, identificar diferencias en la cadena de nucleótidos que permitan distinguir especies filogenéticamente cercanas. El estudio de tales diferencias suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. En algunos casos, se emplean programas que estudian las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas en varias especies, tales como PAUP (Swofford, 1993) PHYLIP (Felsenstein, 1993) y TREECON (Van de Peer y De Wachter, 1993). En otros casos, la elaboración de matrices de distancias genéticas entre secuencias (Kimura, 1980; Tajima y Nei, 1984) es más apropiada para diferenciar especies que los estudios filogenéticos (Quinteiro y col., 1998).

La técnica de PCR-secuenciación proporciona resultados interesantes en la identificación de especies, pero es cara, laboriosa y requiere personal especializado, por lo que no resulta adecuada para el análisis cotidiano de un gran número de muestras. Sin embargo, el análisis con enzimas de restricción de los fragmentos amplificados mediante PCR, permite detectar diferencias en la longitud de los fragmentos generados (polimorfismo) sin necesidad de recurrir a la secuenciación. Cabe destacar, que este método genético no detecta todas las diferencias entre las secuencias, ya que tan solo detecta aquellas que afectan a los lugares de reconocimiento de las enzimas utilizadas para el análisis.

Para la identificación especies mediante la técnica de PCR-RFLP se pueden conocer previamente o no las secuencias del fragmento a analizar. Sin embargo, es muy importante la elección de endonucleasas adecuadas, ya que éstas no deben producir variaciones intraespecíficas. Por lo tanto, la eficacia de esta técnica va a depender de la secuencia elegida para la amplificación, de las

endonucleasas de restricción utilizadas y de la longitud del fragmento amplificado.

En moluscos, la técnica de PCR-RFLP se ha aplicado principalmente para estudiar la herencia del ADNmt, así como las relaciones filogenéticas de las especies de mejillón *Mytilus* spp. Rawson y Hilbish (1995), amplificaron por PCR un fragmento de 527 pb de la subunidad grande del gen mitocondrial 16S ARNr y lo cortaron con tres enzimas de restricción para estudiar la frecuencia de los haplotipos paternos o maternos, ya que en este género el ADN mt puede heredarse de ambos parentales. Saavedra y col. (1996), aplicaron la técnica de PCR-RFLP con la misma finalidad, pero en este caso estudiaron la subunidad 3 de la citocromo oxidasa (COIII) en las especies *M. edulis*, *M. trossulus* y sus híbridos. Para ello emplearon dos endonucleasas que permitieron identificar el origen paterno o materno del ADNmt de los individuos objeto de estudio.

Claxton y col. (1997) identificaron dos especies exóticas de mejillón (*Dreissena polymorfa* y *Dreissena bugensis*) mediante PCR-RFLP, utilizando un fragmento de 710 pb del gen que codifica la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI). De forma similar, Toro (1998) utilizó dos marcadores nucleares (el espaciador interno de la transcripción *ITS* y la proteína de adhesión a superficies *Glu-5*) y un marcador mitocondrial (subunidad 3 del gen citocromo oxidasa) para la identificación de especies de mejillón. Con los tres marcadores genéticos comprobó mediante PCR-RFLP que los genomas de las especies *M. edulis* y *M. trossulus* eran diferentes. Sin embargo, las especies *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* mostraron el mismo perfil de restricción para el gen mitocondrial y el gen nuclear *ITS*, mientras que *M. edulis* y *M. chilensis* produjeron bandas específicas de especie para el marcador nuclear *Glu-5*.

Entre los ejemplos que se pueden citar de la utilización de la técnica de PCR-RFLP en otras especies de moluscos, se encuentran los trabajos de Kenchington y col. (1993) para diferenciar dos especies de vieiras (*Placopecten magellanicus* y *Chlamys islandica*) utilizando un fragmento de 1.815 pb del gen 18S ARNr, y los de Foighil y col. (1995), que diferenciaron dos especies de ostras (*Crassostrea gigas* y *C. virginica*) empleando un fragmento de 443 pb del gen mitocondrial 16S ARNr. Asimismo, Baldwin y col. (1996) comprobaron que era posible la identificación de cinco especies de moluscos bivalvos

(*Dreissena polymorpha*, *D. bugensis*, *Corbicula fluminea*, *Mytilopsis leucophaeata*, y *Rangia cuneata*), mediante la amplificación de 710 pb de la subunidad 1 del gen mitocondrial citocromo oxidasa (COI), seguida de la digestión de los fragmentos amplificados con una única enzima de restricción.

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral consistió en poner a punto técnicas genéticas adecuadas para la identificación inequívoca de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia. Para ello, se consideró adecuada la técnica de PCR-RFLP, ya que proporciona perfiles claros y de fácil interpretación, especialmente cuando las muestras problema se analizan junto a muestras de referencia.

Asimismo, se empleó la técnica de RT-PCR para analizar el extremo 3' del gen que codifica la enzima arginina quinasa en las cuatro especies de almejas de interés. Con este estudio se pretendía localizar secuencias peptídicas especie-específicas y diseñar péptidos sintéticos que permitieran obtener anticuerpos de especificidad predeterminada. Las fosfagen quinasa constituyen una familia de enzimas de secuencia bastante conservada. En concreto, se eligió la enzima arginina quinasa porque está ampliamente distribuida en invertebrados, y ha sido secuenciada en varias especies, incluyendo equinodermos (Suzuki y col., 1999), la anémona de mar *Anthopleura japonicus* (Suzuki y col., 1997a), crustáceos (Dumas y Camonis, 1993; Furukohri y col., 1994) y varios moluscos (Suzuki y Furukohri, 1994; Suzuki y col., 1997b; Suzuki y col., 1998).

V.1.6. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA, FINA, ITALIANA, Y RUBIA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN α -ACTINA

La actina es una de las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución (Pollard y Cooper, 1986) y se encuentra en todas la células eucariotas (Zakut y col., 1982). Las actinas son proteínas globulares que polimerizan en filamentos e intervienen en la motilidad y estructura celular, y en la contracción y relajación muscular a través del Ca^{2+} (Pollard y Cooper, 1986). Esta proteína multifuncional está codificada por una familia multigénica en animales, protozoos y plantas, y tiene seis isoformas en vertebrados, entre las

que se incluyen dos actinas citoplasmáticas (β y γ), y cuatro tipos de proteínas musculares α -actina (esquelética, cardíaca, del músculo liso de la aorta y estomacal) (Vandekerckhove y Weber, 1979). Se han realizado varios estudios para analizar la posición de los intrones y exones a lo largo de la secuencia codificadora de esta proteína (Weber y Kabsch, 1994). El número total de intrones del gen de la actina puede variar de cero a ocho. Así por ejemplo, el único gen de la actina presente en la especie de alga *Volvox cateri* tiene ocho intrones, mientras que en los vertebrados superiores hay dos genes de la α -actina del músculo liso (α y γ) y tienen siete intrones. Cabe destacar que algunas especies de eucariotas inferiores tienen uno o incluso carecen de intrones, como es el caso de las dos especies de artrópodos *Bombyx mori* y *Drosophila melanogaster*.

En las bases de datos están disponibles las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las actinas en varias especies, entre las que se incluyen humanos (Taylor y col., 1988), ratón (Hu y col., 1986), rata (Zakut y col., 1982), pollo (Fornwald y col., 1982), carpa y carpín (Watabe y col., 1995), y vieira (Patwary y col., 1996). En invertebrados, no se conoce con precisión la relación existente entre la estructura primaria de estas proteínas y su función en los diferentes tipos de células. De hecho, las actinas procedentes de las células musculares de los géneros de moluscos *Pecten* y *Loligo* son más parecidas a las actinas citoplasmáticas de los vertebrados que a las α -actinas musculares (Vandekerckhove y Weber, 1984).

Aunque las secuencias codificadoras de los genes de las distintas actinas son muy conservadas, sus intrones varían en posición y tamaño. Esta propiedad ha hecho posible la utilización del gen de la actina muscular para la identificación de especies, ya que diseñando cebadores en regiones conservadas del gen, se pueden amplificar fragmentos con diferentes perfiles electroforéticos, debido a las diferencias en los tamaños de los intrones. De este modo, se ha conseguido identificar carne de varias especies, como vaca, oveja y caballo (Fairbrother y col., 1998), y también pollo, cerdo y pavo (Hopwood y col., 1999).

Los cebadores empleados en este trabajo (act-2 y act-4), fueron diseñados por Watabe y col. (1995) basándose en las regiones conservadas de los genes de la proteína α -actina de varias especies animales. Esta pareja de cebadores amplificó un fragmento de 521 pb a partir de las muestras de almejas babosa, fina, italiana y rubia (Figura 53).

Las secuencias de los productos de PCR de las especies de almejas objeto de análisis se compararon entre sí y con la secuencia de ADNc de la vieira (*Placopecten magellanicus*) (número de acceso U55046) de la base de datos GenBank (Figura 54). También se compararon las secuencias obtenidas a partir de las almejas babosa, fina, italiana y rubia, con las secuencias del ADNc del gen que codifica la actina muscular humana (M20543), de ratón (M12866), pollo (K02259), carpa (D50028), y carpín (D50029), obtenidas de la base de datos GenBank/EMBL. Tras la comparación de las secuencias de ADNc citadas y las secuencias de las especies de almejas, se llegó a la conclusión que las secuencias de los productos de PCR obtenidos a partir de las almejas eran similares a las secuencias de ADNc, es decir, carecían de intrones. Por lo tanto, las secuencias del gen α -actina obtenidas a partir de muestras de almejas perdían los tres intrones presentes en este gen en posiciones conservadas en el hombre, ratón, rata y pollo (Taylor y col., 1988; Zakut y col., 1982; Fornwald y col., 1982; Hu y col., 1986).

Probablemente, la pérdida de intrones en los productos de PCR amplificados a partir de muestras de almejas, se debió a la amplificación de pseudogenes con esta pareja de cebadores. Además, la inserción de un nucleótido en la secuencia de almeja italiana (*R. philippinarum*) en la posición 54 (Figura 54), produce un desplazamiento en el marco abierto de lectura (ORF), dando lugar a varios codones de terminación, característica que se encuentra frecuentemente en los pseudogenes (Proudfoot, 1980). La amplificación de pseudogenes sin intrones, como consecuencia de la utilización de cebadores diseñados a partir de regiones conservadas de los exones, ha sido descrita en numerosas ocasiones. Lessa y Applebaum (1993), tuvieron dificultades al utilizar oligonucleótidos diseñados a partir de los exones del gen que codifica la insulina. Del mismo modo, Slade y col. (1993) tuvieron que diseñar cebadores con varios nucleótidos dentro de la secuencia del intron de

los genes de la histona y mioglobina, para evitar la amplificación de pseudogenes. Además, se han descrito también pseudogenes del gen actina en pollo (Schwartz y Rothblum, 1980) y plantas del género *Petunia* (*Petunia hybrida*) (McLean y col., 1990), así como la amplificación de pseudogenes nucleares de fragmentos del gen citocromo *b* en especies de caza (Perna y Kocher, 1996; Burgener y Hübner, 1998) entre otros.

Estos antecedentes permiten concluir que la amplificación de pseudogenes no es una excepción, sino que se puede dar con cierta facilidad. La ausencia de amplificación de genes con intrones puede deberse a que los pseudogenes, al ser mucho más cortos, se amplifican con mayor eficiencia. No obstante, tanto los pseudogenes como los espaciadores intergénicos no codificantes (NTSs), han sido descritos como secuencias apropiadas para el estudio de especies muy relacionadas, ya que son secuencias en las que se produce una rápida sustitución y homogeneización (Slade y col., 1993; Sajdak y col., 1998).

Para llevar a cabo la diferenciación de las cuatro especies de almejas, se seleccionaron endonucleasas con las que digerir los productos de PCR obtenidos con los cebadores act-2 y act-4. En el análisis genético de especies mediante la técnica de PCR-RFLP se pueden utilizar enzimas de restricción al azar, o bien la elección puede estar basada en el conocimiento y comparación previos de las secuencias del fragmento a analizar. La elección de enzimas al azar puede dar lugar a buenos resultados, pero generalmente conlleva la utilización de un elevado número de enzimas que, de no disponer de ellas en el laboratorio, encarecen la puesta a punto del análisis. Sin embargo, la comparación previa de las secuencias permite seleccionar las enzimas que resultan más apropiadas. En este trabajo, se prefirió estudiar y comparar previamente las secuencias de cada una de las especies para seleccionar las enzimas a utilizar. Teniendo en cuenta los mapas de restricción de las secuencias correspondientes a las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, así como la disponibilidad comercial de las enzimas, se eligieron las endonucleasas *Rsa* I y *Mae* III.

Las dos dianas de restricción de la enzima *Rsa* I (GT↓AC) en la almeja fina, no se encuentran en las secuencias de las almejas babosa, italiana y

rubia, que presentan en su lugar (CTAC) y (GCAC). La endonucleasa *Mae* III, tiene dos dianas de restricción en las almejas babosa y fina, y tres en las almejas italiana y rubia. Esto es debido a que la tercera diana de restricción de la enzima *Mae* III (\downarrow G $\overline{T$ NAC), se sustituye por (G \overline{C} GAC) en las especies de almejas babosa y fina. Los resultados obtenidos tras la digestión de los productos de PCR corroboraron los pronósticos derivados del análisis de las secuencias, sin que se pusiera de manifiesto polimorfismo intraespecífico entre las muestras analizadas (*Figura 59*). No obstante, la gran similitud entre las secuencias de las almejas italiana y rubia, con un porcentaje de homología del 98,84%, impidió localizar una enzima que permitiera diferenciarlas. Estos resultados demuestran que la amplificación y análisis de restricción (PCR-RFLP) del fragmento del gen α -actina amplificado con los cebadores act-2 y act-4, permite diferenciar claramente las especies de almejas babosa y fina entre sí, y de las especies de almejas italiana y rubia, pero no diferencia la almeja italiana de la rubia.

La técnica de PCR-RFLP combina una buena capacidad de resolución con las características de sencillez, rapidez y bajo coste, por lo que constituye una alternativa interesante a las técnicas convencionales de identificación de especies de moluscos basadas en el análisis de proteínas (Secchi y col., 1982; Watabe y col., 1990; Hu y col., 1992; Kitts y col., 1997; Etienne y col., 2000) y frente a las técnicas de secuenciación de los productos de PCR. Sin embargo, la presencia de polimorfismo intraespecífico puede representar una limitación de la técnica de PCR-RFLP (Ram y col., 1996). Aunque en nuestro trabajo no se ha detectado variabilidad intraespecífica en las dianas de restricción de las endonucleasas utilizadas tras analizar 15 individuos de cada especie, sería preciso analizar un número más elevado de muestras para garantizar la ausencia de polimorfismo intraespecífico, y siempre sería posible encontrar algún individuo que no presentara el perfil de restricción típico de su especie debido a una mutación puntual en la secuencia diana. Esta circunstancia, si bien poco probable, haría necesario recurrir a otros marcadores específicos de especie. Por otra parte, el resto de las técnicas genéticas aplicables a la diferenciación de especies, como PCR-Secuenciación, PCR-SSCP y, en mayor

medida RAPD, comparten la limitación que supondría encontrar polimorfismo intraespecífico.

V.1.7. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA, FINA, ITALIANA Y RUBIA MEDIANTE PCR-SSCP DE UN FRAGMENTO DEL GEN α -ACTINA

Al no encontrar una diana de restricción que permitiera diferenciar mediante PCR-RFLP las almejas italiana y rubia a partir del fragmento de 521 pb del gen α -actina (*Figura 59*), se decidió emplear la técnica de PCR-SSCP con el fin de obtener patrones de bandas de ADN específicos que permitieran su diferenciación. Esta técnica fue utilizada por primera vez en la identificación de especies de pescado por Hara y col. (1994). Actualmente, existen varios trabajos de investigación en los que se ha conseguido identificar mediante PCR-SSCP diversas especies del género *Anguilla*, salmónidos, esturión, gádidos, túnidos, peces planos y mamíferos marinos, entre otros (Rehbein y col., 1995b; 1997a, 1997b; 1999b, 1999c; Céspedes y col., 1999b; Martínez y Danielsdóttir, 2000). Esta técnica permite detectar cualquier diferencia en las secuencias de ADN (Lessa y Applebaum, 1993; Rea y col., 1996), a diferencia de la técnica de PCR-RFLP, en la que solo se detectan diferencias que afectan al lugar de reconocimiento de una enzima de restricción.

Antes de seleccionar un fragmento génico de ADN para su posterior análisis mediante SSCP es preciso tener en cuenta una serie de premisas: (1) las cadenas ricas en bases púricas pueden ser más sensibles a los cambios de bases que las cadenas ricas en bases pirimidínicas; y (2) los fragmentos menores de 300 pb son más susceptibles de revelar las sustituciones en una base. A pesar de esto, el tamaño del fragmento y la secuencia adyacente al mismo, pueden tener efectos impredecibles en los cambios de movilidad asociados a determinados cambios de base (Hayashi, 1991; Spinardi y col., 1991; Fujita y Silver, 1994).

Considerando estos factores, se seleccionó un fragmento de 150 pb del gen α -actina, el cual se amplificó con los cebadores act-5 y act-6 (*Figura 54*). Estos cebadores se diseñaron teniendo en cuenta las secuencias del gen de la α -actina muscular obtenidas previamente (Fernández y col., 2000a). La

concentración de ADN de partida en las reacciones de PCR fue de 1.000 ng, con el fin de tener un número elevado de copias iniciales de ADN, ya que la técnica de PCR-SSCP es mucho más sensible que otras técnicas genéticas a los errores de replicación durante la reacción de PCR (Hayashi, 1991). Se analizaron 15 individuos de cada una de las especies de almejas (babosa, fina, italiana y rubia) en las que se amplificó con éxito el fragmento de 150 pb objeto de análisis (*Figura 60*).

Para analizar un fragmento de ADN mediante la técnica de PCR-SSCP, es importante considerar la concentración y pureza del producto de PCR. Cuando los productos de PCR desnaturalizados se encuentran en concentraciones elevadas pueden volver a unirse, complicando los perfiles que se obtienen por SSCP. Además, los cebadores libres, incluso a concentraciones de 150-600 nM, pueden unirse a las cadenas de ADN y alterar su movilidad (Qiu-Qiong y Touitou, 1993). Para evitar estos problemas se purificaron los productos de PCR con el *Qiaquick Qiagen Gel Extraction Kit* y se ajustó la concentración de ADN de las muestras purificadas a 7 ng/ μ L con agua bidestilada estéril.

En el análisis mediante SSCP, la movilidad del ADN monocatenario en el gel puede variar en función de la temperatura a la que se lleva a cabo la electroforesis, debido a que la conformación de las bandas de ADN monocatenario es dependiente de la temperatura (Inazuka y col., 1997). Por ello, en este trabajo se han utilizado temperaturas bajas (inferiores a 4°C) durante la electroforesis, ya que la mayoría de los fragmentos de ADN monocatenario tienen una conformación más estable a temperaturas bajas (Hayashi y Yandell, 1993).

Sin embargo, al analizar mediante SSCP el fragmento de 150 pb del gen α -actina de las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, se obtuvieron patrones similares en las almejas fina, italiana y rubia (*Figura 61*). Se obtuvieron perfiles específicos para la identificación de muestras de almeja babosa frente a las especies de almejas fina, italiana y rubia. Por lo tanto, el análisis mediante PCR-SSCP del fragmento seleccionado del gen α -actina tampoco permitió la diferenciación de las especies de almejas italiana y rubia.

Como se ha indicado en la introducción, la técnica de PCR-SSCP es bastante empírica, y no existe una teoría capaz de explicar y predecir la conformación de las moléculas de ADNmc en base a su secuencia, o la movilidad de dichas moléculas en función de su conformación (Iwahana y col., 1992; Fujita y Silver, 1994). En los 150 pb de las secuencias de almejas analizadas, la almeja fina presenta 7 nucleótidos diferentes de las almejas babosa y rubia, y 3 nucleótidos distintos de la almeja italiana. Sin embargo, la proporción de mutaciones que es posible detectar mediante SSCP depende de numerosos factores como la temperatura, la concentración del gel, la proporción de acrilamida/bisacrilamida, el tipo de solución desnaturalizante utilizado, la concentración del tampón, o la adición de diversos compuestos a la matriz del gel (Fan y col., 1993). Todos estos factores se han tenido en cuenta en este trabajo, pero además, la eficiencia del análisis de SSCP depende de la secuencia estudiada, pudiendo variar significativamente de un fragmento a otro. Cambios en la movilidad de fragmentos de ADN de aproximadamente igual composición de bases, indican que los resultados del análisis de SSCP también dependen del tamaño (Glavac y Dean, 1993). Incluso mutaciones que no proporcionan cambios en la movilidad del ADNmc en unas determinadas condiciones, pueden ser detectadas fácilmente bajo otras condiciones (Fujita y Silver, 1994). El experimento se llevó a cabo bajo condiciones estrictamente controladas utilizando el sistema electroforético *PhastSystem*TM (Pharmacia), lo que facilitó en gran medida la puesta a punto del análisis de PCR-SSCP.

El sistema *PhastSystem*TM proporciona una semiautomatización del proceso y además aporta otras características interesantes: (1) la temperatura, el voltaje y la intensidad se pueden ajustar con el fin de optimizar la separación (Mohabeer y col., 1991), (2) comercialmente existe una amplia variedad de tampones y geles de poliacrilamida, que se pueden seleccionar dependiendo de las características que se requieran (Rehbein, 1997a); y (3) la tinción con plata automatizada en la unidad de revelado del *PhastSystem*TM simplifica y acorta la etapa de detección, proporcionando un registro permanente de los resultados sin necesidad de emplear radioisótopos. Además, el tiempo total empleado en la electroforesis y tinción de las muestras fue de aproximadamente 2 h, lo que hace que este método sea adecuado para llevar

a cabo la identificación de especies en laboratorios de análisis y control de calidad.

En comparación con otros métodos genéticos, la técnica de PCR-SSCP presenta ciertas ventajas: (1) al poderse analizar fragmentos de ADN pequeños, hace posible el análisis de muestras degradadas durante el procesado, incluso muestras sometidas a tratamientos de esterilización (Rehbein y col., 1995b), (2) en algunos casos, permite detectar diferencias en una sola base, lo cual supone una ventaja frente a la técnica de PCR-RFLP, que está condicionada por la existencia de enzimas de restricción que tengan su diana en el lugar de la mutación (Oohara, 1997); (3) la variabilidad intraespecífica de los perfiles obtenidos mediante SSCP es más baja que la encontrada en los obtenidos con las técnicas RFLP y RAPD (Bardakci y Skibinski, 1994); (4) las mutaciones se detectan mediante cambios en la movilidad de las moléculas, no mediante ausencia de señal como sucede en otras técnicas genéticas, por lo que un fallo en la amplificación por PCR no da lugar a falsos positivos (Hayashi, 1991).

No obstante, esta técnica tiene una serie de inconvenientes: (1) la necesidad de analizar especies de referencia junto con las muestras en el mismo gel; (2) el bajo contenido de información genética que proporciona el patrón de SSCP (Rehbein y col., 1997a), y (3) la necesidad de llevar a cabo el análisis bajo condiciones muy controladas, con el fin de obtener resultados reproducibles.

V.1.8. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA, FINA E ITALIANA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL ESPACIADOR INTERNO DE LA TRANSCRIPCIÓN (ITS)

El ADN ribosomal suele estar codificado en un gen que se repite un gran número de veces consecutivas y está constituido por las regiones codificadoras (18S, 5,8S y 28S), los espaciadores de la transcripción (internos: ITS-1 e ITS-2, y externos 5' ETS y 3' ETS), y la región espaciadora intergénica (IGS). El grado de mutación de las regiones codificadoras es muy lento y el de los espaciadores internos de la transcripción (ITS) moderado, lo que hace que estas regiones sean útiles en estudios de poblaciones y en la comparación de

especies filogenéticamente muy relacionadas (Mindell y Honeycutt, 1990). Sin embargo, los espaciadores externos de la transcripción (ETS) y la región espaciadora intergénica (IGS) tienen una tasa de mutación más rápida, siendo útiles en la comparación de individuos pertenecientes a la misma especie.

El primer espaciador interno de la transcripción (ITS-1) se ha utilizado en numerosas ocasiones para estudios filogenéticos de pescados, entre los que se incluyen especies pertenecientes a los géneros *Salvelinus* (Pleyte y col., 1992; Phillips y col., 1994; Phillips y col., 1999; Reed y Phillips, 2000), *Oncorhynchus* (Domanico y col., 1997), *Coregonus* (Sajdak y Phillips, 1997), *Clupea* (Domanico y col., 1996), así como peces cíclidos (Booton y col., 1999). También se han realizado estudios filogenéticos empleando el ADNr en primates (Gonzalez y col., 1990), invertebrados (Fritz y col., 1994; King y col., 1999) y plantas (Torres y col., 1990; Van Opper y col., 1995).

Utilizando los cebadores ITS-1 e ITS-2 diseñados por Heath y col. (1995), en este trabajo se amplificó un fragmento de 1.075 pb en la almeja babosa, 1.195 pb en la almeja fina y 1.188 pb en la almeja italiana, cuya longitud exacta se determinó tras la secuenciación de los productos de PCR (Figura 62). Por lo tanto, la longitud de los productos de PCR amplificados con esta pareja de cebadores puede servir como una primera aproximación para la identificación de las especies de almejas babosa, fina e italiana. Sin embargo, no se puede utilizar como único criterio para la identificación de estas especies de almejas, por lo que se realizó un estudio complementario de la especificidad de las secuencias obtenidas.

En el caso de la almeja rubia, con los cebadores ITS-1 e ITS-2 se amplificaron dos productos de PCR de 1.000 pb y 1.200 pb, aproximadamente (Figura 62). En algunos individuos de esta especie, se amplificaba mejor la banda de 1.200 pb, mientras que en otros predominaba el fragmento de 1.000 pb, o bien solo se amplificaba alguno de los dos fragmentos. Al no proporcionar un único producto de PCR se descartó la posibilidad de emplear este marcador genético para la identificación mediante PCR-RFLP de la almeja rubia, porque podría dar lugar a perfiles electroforéticos complejos y mayor variabilidad intraespecífica, dificultando la interpretación de los resultados.

La secuencia nucleotídica de la región 5,8S fue idéntica en las tres especies de almejas analizadas (158 pb), lo que permitió corroborar que dicha región codificadora es muy conservada entre las especies. Asimismo, la homología entre la secuencia de la región 5,8S de las almejas babosa, fina e italiana y dicha secuencia en el hombre (J01866), erizo de mar (LVRRNA01) y el molusco gastrópodo *Oncomelania hupensis* (U93222) estuvo comprendida entre un 84%-85%.

Las diferencias existentes en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos génicos amplificados en las especies de almejas babosa, fina e italiana, se pusieron de manifiesto por la comparación detallada de sus mapas de restricción (*Figuras 64, 65 y 66*). Se seleccionaron las enzimas de restricción *Rsa* I (GT↓AC) y *Hinf* I (G↓ANTC), que permitieron diferenciar los productos de PCR de las almejas babosa, fina e italiana (Fernández y col., 2001). Las diferencias en la longitud de los fragmentos de ADN resultantes de la digestión es suficiente para permitir su visualización mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa (*Figura 67*).

Como se ha indicado en resultados, la digestión de los productos de PCR de la almeja babosa con la enzima *Hinf* I dio lugar a un fragmento de 804 pb en todos los individuos analizados, además de los fragmentos génicos esperados. Este hecho puede explicarse por una digestión incompleta en la posición 286 (*Figura 63*), en la que se encuentra una diana de restricción de la enzima. La causa de esta digestión incompleta se desconoce, pero no parece deberse a que el producto de PCR procediera de una mezcla de especies, ya que la endonucleasa *Rsa* I no dio lugar a perfiles de restricción que reflejaran una mezcla de especies. Además, otros autores también han comentado este fenómeno con otras enzimas. Ram y col. (1996), no consiguieron digerir totalmente un fragmento de 120 pb del gen citocromo b de diversas especies de túnidos, empleando las endonucleasas *Rsa* I y *Kpn* I. Asimismo, Céspedes y col. (1998) obtuvieron una digestión incompleta en los productos de PCR del gen citocromo b en lenguado (*Solea solea*) con la enzima *Sau* 3AI. Además, en la bibliografía se pueden encontrar trabajos en los que se indica un comportamiento anómalo de numerosas enzimas de restricción, que presentan dianas resistentes al corte, así como puntos de corte selectivos (Krüger y col.,

1988; Vissel y Choo, 1988; Conrad y Topal, 1989; Brinkley y col., 1991; Oller y col., 1991; Pein y col., 1991; Topal y col., 1991).

Se analizaron 15 individuos de cada una de las especies, no observándose ninguna variación intraespecífica en los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas *Rsa* I y *Hinf* I.

En la bibliografía se encuentran varios trabajos sobre las variaciones intra e interespecíficas de los espaciadores internos de la transcripción (King y col., 1999). Phillips y col. (1992), comprobaron la presencia de variación en la longitud de la región intergénica (IGS) en 17 especies de salmónidos, sin embargo no encontraron variación intraespecífica en las regiones del espaciador interno de la transcripción (ITS-1 e ITS-2) utilizando 15 enzimas de restricción diferentes, de las que 3 tenían su diana de restricción en los espaciadores internos de la transcripción. Asimismo, Zhuo y col. (1994), no encontraron variaciones intraespecíficas en las secuencias de la región ITS-1 procedentes de 10 individuos de la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*). Del mismo modo, Reed y col. (2000) han estudiado recientemente las variaciones intraespecíficas del espaciador ITS-1 en 20 clones procedentes de la trucha lacustre (*S. namaycush*). Estos autores comprobaron que las secuencias de la región ITS-1 eran idénticas en todos los clones analizados. Estos resultados confirman que las secuencias adyacentes al ARNr (como las regiones del espaciador externo 5' y 3' ETS) tienden a ser más variables que los espaciadores internos de la transcripción (ITS-1 e ITS-2).

Teniendo en cuenta que no se ha detectado polimorfismo intraespecífico entre las muestras de las especies de almejas babosa, fina e italiana en las dianas de restricción analizadas en este trabajo, se puede afirmar que el análisis de los espaciadores internos de la transcripción por la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta sensible y fiable para la diferenciación específica de muestras de almejas. Las ventajas y limitaciones de la utilización de este marcador genético son similares a las descritas para el gen α -actina. El tamaño de los fragmentos amplificados hace posible identificar un elevado número de puntos de restricción específicos de especie que se detectan fácilmente por electroforesis en geles de agarosa. Además, la interpretación inequívoca de los resultados puede apreciarse visualmente sin la necesidad de

un análisis informático de los mismos. No obstante, el éxito de la amplificación de fragmentos génicos grandes está condicionado por la posibilidad de extraer ADN de elevado tamaño molecular a partir de muestras de las especies de almejas analizadas.

V.1.9. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA, FINA, ITALIANA Y RUBIA MEDIANTE PCR-RFLP DE UN FRAGMENTO DEL GEN MITOCONDRIAL 16S ARNr

Como se ha indicado en la introducción, el ADNmt posee dos genes que codifican subunidades del ARN ribosómico: uno de la subunidad pequeña del ribosoma (12S ARNr) y otro de la subunidad grande (16S ARNr). La variabilidad de estos genes se manifiesta en la presencia tanto de sustituciones como de inserciones o deleciones de nucleótidos. Como sucede en los genes mitocondriales que codifican proteínas, las transiciones con más frecuentes que las transversiones, especialmente entre especies filogenéticamente cercanas. No obstante, la presencia de inserciones y deleciones es más frecuente en los genes mitocondriales que codifican ARN ribosómico que en aquellos que codifican proteínas, siendo más marcadas las diferencias de longitud en el gen 16S ARNr que en el 12S ARNr (Meyer, 1993).

El gen mitocondrial 16S ARNr constituye una herramienta muy útil en estudios filogenéticos, proporcionando información importante para la sistemática de vertebrados marinos y terrestres (Allard y col., 1992; Milinkovitch y col., 1993), así como de invertebrados (Cunningham y col., 1992; Geller y col., 1993; Rumbak y col., 1994; Bucklin y col., 1995; Canapa y col., 1996).

Se han desarrollado numerosos estudios encaminados a la identificación de especies mediante PCR-RFLP de los genes 12S ARNr y 16S ARNr, entre los que se incluye la diferenciación de especies de crustáceos (Bouchon y col., 1994), moluscos (Foighil y col., 1995; Borgo y col., 1996) y peces (Chow y col., 1993; Aoyama y col., 2000). Considerando estas premisas, en este trabajo se utilizaron los cebadores diseñados por Palumbi y col. (1991), que permitieron la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial 16S ARNr a partir de muestras de las cuatro especies de almejas objeto de estudio.

Los cebadores 16SAR y 16SBR amplificaron un fragmento de 511 pb en la almeja babosa, 523 pb en la almeja fina, 545 pb en la almeja italiana y 502 pb en la almeja rubia del gen 16S ARNr (*Figura 68*). Las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas a partir de los productos de PCR de las cuatro especies de almejas se compararon entre sí y con la secuencia del mejillón *Mytilus edulis* (U22864), disponible en la base de datos GenBank/EMBL (*Figura 71*). El porcentaje de homología entre las secuencias de las cuatro especies de almejas y la del mejillón *Mytilus edulis* estuvo comprendido entre 50-60%, mientras que la homología entre la secuencia de los productos de PCR de la almeja fina y las de las almejas babosa, italiana y rubia fue 80,58%, 78,86% y 79,11% respectivamente.

Aunque la longitud de los productos de PCR obtenidos a partir de las cuatro especies de almejas difería en algunos pares de bases, su movilidad electroforética era similar, por lo que se recurrió a digerir los productos de PCR de dichas especies con enzimas de restricción. La comparación de los mapas de restricción de los fragmentos del gen 16S ARNr amplificados en las almejas babosa, fina, italiana y rubia (*Figuras 72-75*) sirvió para identificar varias endonucleasas de restricción que diferenciaban específicamente los productos de PCR de las cuatro especies. De ellas se seleccionaron dos (*Bsm* AI y *Bsr* I) siguiendo criterios de especificidad y disponibilidad comercial.

La enzima *Bsm* AI (5'-GTCTC(N)₁↓-3') proporciona patrones de bandas de restricción que permiten diferenciar las cuatro especies de almejas (*Figura 76*). Sin embargo, los fragmentos de ADN generados tras la digestión con esta enzima en las especies fina y rubia fueron bastante similares, con lo que se decidió seleccionar otra endonucleasa que permitiera mejorar estos resultados. De este modo, se eligió la enzima *Bsr* I (5'-ACTGGN↓-3'), que no cortó los productos de PCR de las almejas babosa y fina, pero sí reconoció una diana de restricción en la almeja italiana, originando fragmentos de 494 pb y 51 pb, y dos dianas en la almeja rubia, dando lugar a tres fragmentos de 328 pb, 126 pb y 48 pb.

Se analizaron 15 individuos de cada una de las cuatro especies de almejas objeto de análisis, no observándose ninguna variación intraespecífica en los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas *Bsm* AI y *Bsr* I. Se

puede afirmar, por tanto, que el análisis del gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta sensible y fiable para la identificación específica de muestras de almejas pertenecientes a las especies babosa, fina, italiana y rubia. De los marcadores genéticos estudiados en este trabajo, el 16S ARNr es el único que permite la identificación de las cuatro especies de almejas. Sin embargo, el hecho de disponer de varios marcadores genéticos para la diferenciación de especies de almejas filogenéticamente próximas, es muy recomendable y puede aportar un soporte técnico adicional ante instancias judiciales para demostrar la veracidad o incorrección del etiquetado de los productos marinos ofrecidos al consumidor.

V.1.10. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DEL EXTREMO 3' DEL GEN QUE CODIFICA LA ARGININA QUINASA EN LAS ESPECIES DE ALMEJAS

Las fosfagen quinasa son enzimas que catalizan la transferencia reversible de grupos fosfato del ATP a compuestos guanidino como la creatina, glicociamina, taurociamina, lombricina y arginina, y desempeñan un papel importante en la producción y utilización de energía en los animales (Kenyon y Reed, 1986). La única enzima fosfagen quinasa que poseen los vertebrados es la creatina quinasa (CK). Sin embargo, en invertebrados, además de la creatina quinasa, se encuentran otras enzimas como la arginina quinasa (AK), glicociamina quinasa (GK), taurociamina quinasa (TK) y lombricina quinasa (LK). La alta homología de las secuencias aminoacídicas de las CK, AK, GK y LK sugiere que proceden de un ancestro común (Morrison, 1973; Suzuki y Furukohri, 1994). Entre estas enzimas, las arginina quinasa son las más ampliamente distribuidas en invertebrados, y generalmente son monoméricas, mientras que otras fosfagen quinasa (CK, GK, TK y LK) suelen tener una estructura dimérica, que consiste en dos subunidades de 40 KDa, con la excepción de la creatina quinasa mitocondrial (homooctamérica) (Wyss y col., 1992) y la creatina quinasa del músculo cardíaco de los mamíferos (heterodimérica) (Eppenberger y col., 1967).

La mayoría de los trabajos publicados sobre las enzimas fosfagen quinasa se refieren a la extracción, caracterización y estudio de la secuencia

aminoacídica derivada del ADN complementario. En concreto, la enzima arginina quinasa se ha estudiado en invertebrados superiores e inferiores, como crustáceos (Livera y Shimizu, 1989; France y col., 1997), equinodermos (Suzuki y col., 1999) y moluscos (Storey, 1977; Suzuki y Furukohri, 1994; Suzuki y col., 1997b; Suzuki y col., 1998) entre otros.

Suzuki y Furukohri (1994), estudiaron la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la glicociamina quinasa del anélido *Neanthes diversicolor*, y dos argininas quinasas procedentes del molusco *Nordotis madaka* y del crustáceo *Penaeus japonicus*. Posteriormente, estos autores estudiaron el gen que codifica las enzimas arginina quinasas de dos especies de moluscos (*Liolophura japonica* y *Battilus cornutus*) (Suzuki y col., 1997b), así como de la especie de almeja *Pseudocardium sachalinensis* (Suzuki y col., 1998). Para amplificar el extremo 3' del gen que codifica la enzima AK a partir del ADNc obtenido de estas especies, utilizaron el cebador oligo-dT-adaptor y un cebador *universal* diseñado para la amplificación de fosfagen quinasas (AKrna). El tamaño del producto de PCR amplificado con esta pareja de cebadores en las especies *N. madaka*, *L. japonica*, *B. cornutus*, *P. sachalinensis* estuvo comprendido entre 900 pb y 1.600 pb.

Suzuki y col. (1997b), estudiaron el gen que codifica la arginina quinasa en el gastrópodo *B. cornutus*. Comprobaron que la secuencia nucleotídica constaba de 1.624 pb que codificaban una proteína de 358 residuos aminoacídicos. Estos investigadores, proponen que varios residuos aminoacídicos de la secuencia del molusco *B. cornutus* son importantes como regiones funcionales de la enzima creatina quinasa en vertebrados. Estos son: (1) la cisteína (Cys) en posición 287, localizada en el centro del sitio activo de la molécula (Furter y col., 1993); (2) el triptófano (Trp) de las posiciones 213 y 230, importante como sitio de unión al ATP (Vasak y col., 1979); y (3) la histidina (His) de la posición 96, que es el candidato más probable como catalizador ácido/base (Chen y col., 1996).

Suzuki y col. (1998), estudiaron también la arginina quinasa en el molusco *P. sachalinensis* cuya secuencia nucleotídica constaba de 2.654 pb, y comprobaron que era dimérica, y constaba de un primer dominio que comprende los residuos 1-363, y un segundo dominio entre los residuos 364-

724. Estos autores, comprobaron que el primer dominio no debía tener actividad enzimática completa, ya que en la región de reconocimiento del sustrato, la asparragina (Asp) situada en posición 7, importante para el reconocimiento de las cargas positivas de la arginina, estaba sustituida por glicina (Gly).

Con el fin de conocer la secuencia aminoacídica de extremo 3' de la enzima arginina quinasa en las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, en primer lugar procedimos a extraer el ARN de las muestras de almejas (sección III.2.3.2.), para posteriormente aislar el ARNm (sección III.2.5.1.). Tras la obtención del ARN mensajero, se procedió a la síntesis del ADNc (sección III.2.5.2.), que se utilizó para la amplificación del extremo 3' del gen arginina quinasa. Al utilizar la pareja de cebadores AKrna y oligo-dT-adaptor para amplificar el extremo 3' en las especies de almejas objeto de análisis, no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que se decidió tratar de amplificar un fragmento de menor tamaño.

Utilizando los oligonucleótidos AKrna y AKom se amplificó un fragmento de 300 pb del gen que codifica la enzima arginina quinasa (*Figura 77*), y tras su secuenciación se diseñó un cebador más específico (AKalm) para las especies de almejas analizadas en este trabajo. Posteriormente, utilizando los cebadores oligo-dT-adaptor y AKalm, se amplificó un fragmento de 700 pb en las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia. Este fragmento fue clonado y secuenciado con los cebadores del vector de clonación, pero sólo se obtuvieron buenas secuencias en la dirección en la que aparecía la secuencia del cebador AKalm.

En los trabajos realizados por Suzuki y col., la secuenciación del extremo 3' se inició utilizando el cebador AKrna y, posteriormente, a partir de las secuencias parciales obtenidas, sintetizaron oligonucleótidos específicos para terminar de secuenciar el extremo 3' del gen arginina quinasa. En esta Tesis Doctoral, se obtuvieron secuencias de aproximadamente 390 pb del gen que codifica la arginina quinasa en las especies de almejas analizadas. Los productos de PCR amplificados por Suzuki y col. (1997b, 1998) con los cebadores AKrna y oligo-dT-adaptor para obtener el extremo 3' del gen que codifica la arginina quinasa fueron de 1.000 pb en *B. cornutus* y 1.600 pb en *P.*

sachalinensis. Sin embargo, en las especies de almejas babosa, fina, italiana y rubia, el fragmento equivalente es de aproximadamente 850 pb.

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR de almeja babosa, fina, italiana y rubia, se compararon entre sí y con las secuencias procedentes de los moluscos *B. cornutus* y *P. sachalinensis*, obtenidas de la base de datos *GenBank* (AB017255 y AB008011, respectivamente) (*Figura 77*). La región nucleotídica secuenciada mostró una homología de la almeja fina respecto a las especies de almejas babosa, italiana y rubia de 85,78%, 95,83% y 86,68%, respectivamente. A su vez, la especie de almeja que presentó una secuencia nucleotídica de mayor homología respecto a la secuencia del molusco *P. sachalinensis* fue la almeja italiana (79,16%), seguida de las almejas fina y rubia (76,54% y 75,71%, respectivamente) y, finalmente, la almeja babosa (69,43%). Por otro lado, *B. cornutus* presentó una homología comprendida entre 64-68% respecto a las cuatro especies de almejas objeto de análisis (*Tabla 20*).

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, éstas se tradujeron a secuencias aminoacídicas empleando el programa TRANSLATE (GCG). Las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de las cuatro especies de almejas se compararon entre sí y con las secuencias de la enzima arginina quinasa de los moluscos *P. sachalinensis* y *B. cortunus* (*Tabla 21*).

Para realizar la comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de las almejas objeto de estudio y la secuencia del molusco *P. sachalinensis* se utilizó el segundo dominio, que como se ha indicado es el que tiene actividad enzimática. Como se puede apreciar en la *Figura 79*, las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de las almejas fina e italiana, ambas pertenecientes al género *Ruditapes*, fueron idénticas. Esto se debe a que el código genético es degenerado, es decir, distintos tripletes pueden codificar el mismo aminoácido. Además, éstas secuencias aminoacídicas fueron las que mayor homología presentaron con relación a la secuencia de *P. sachalinensis* (89,28%), seguidas de las almejas rubia (88,18%) y babosa (77,98%). Sin embargo, la secuencia aminoacídica del molusco gastrópodo *B. cornutus* presentó una mayor homología con la almeja rubia (78,74%), que con las almejas fina e italiana (75,71%), y babosa (72,6%).

El estudio comparativo entre las secuencias del extremo 3' del gen arginina quinasa en las especies de almejas analizadas (*Figura 79*), mostró que en los 130 residuos aminoacídicos deducidos a partir del ADNc, la homología entre la secuencia aminoacídica de las almejas fina/italiana y babosa fue de 90,71%, mientras que entre las almejas fina/italiana y rubia fue de 91,33%. Como cabría esperar, las secuencias aminoacídicas obtenidas en las especies de almejas objeto de estudio, presentan mayor homología con la secuencia de la especie de almeja *P. sachalinensis* que con la obtenida del molusco gastrópodo *B. cornutus*. Por otra parte, el fragmento aminoacídico objeto de análisis en las cuatro especies de almejas presenta los aminoácidos conservados que se consideran importantes para la actividad enzimática. Así, el triptófano situado en la posición 2 y la cisteína localizada en la posición 53 en las cuatro especies de almejas (*Figura 79*), se corresponderían con los residuos 213 (Trp) y 287 (Cys) de la secuencia de *B. cornutus* y con los residuos 564 (Trp) y 589 (Cys) de la secuencia de *P. sachalinensis*. La *Figura 79*, muestra que el primer aminoácido deducido de las secuencias aminoacídicas en las almejas objeto de estudio, correspondería a los residuos aminoacídicos 213 y 563, mientras que el último aminoácido correspondería a los residuos 342 y 711 de las secuencias que codifican para la enzima arginina quinasa en los moluscos *B. cornutus* y *P. sachalinensis*, respectivamente.

Como se ha indicado, el extremo 3' presenta aminoácidos específicos de especie para las almejas babosa y rubia. Utilizando el programa PEPTIDE STRUCTURE (GCG), se comprobó que la región situada entre las posiciones 72 y 81 (*Figura 79*) constituía un péptido de 9 aminoácidos que podría utilizarse para la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada. La secuencia aminoacídica del péptido sería Cys-Lys-His-Pro-Asp-Phe-Lys-Ala-Lys en la almeja babosa y, Cys-Lys-Gln-Ala-Asp-Phe-Lys-Thr-Val en la almeja rubia. Además, la mayoría de los autores relacionan las regiones hidrofílicas de una proteína con zonas potencialmente constitutivas de epítomos lineales (Van Regenmortel y col., 1988). Este péptido de 9 aminoácidos, está situado en una zona con buenos índices hidrofílicos (comprendidos entre 0,3 y 1,5) y presenta la particularidad de iniciarse en el aminoácido cisteína (Cys), lo que es importante para la conjugación del péptido a proteínas portadoras. Esto es

debido a que muchos péptidos de pequeño tamaño (< 5-8 kDa) son antigénicos pero carecen de inmunogenicidad, es decir, se comportan como haptenos y necesitan ser conjugados a proteínas portadoras. Los residuos del péptido que habitualmente están implicados en la conjugación a la molécula portadora son los aminoácidos lisina, cisteína, grupos amino y carboxi terminales y los residuos cargados. Por lo tanto, para las almejas babosa y rubia se podrían sintetizar péptidos que al conjugarse con moléculas portadoras dieran lugar a la obtención de anticuerpos específicos en animales de experimentación.

Sin embargo, las especies del género *Ruditapes* presentan una secuencia aminoacídica idéntica en el extremo 3' de la enzima. En este caso, sería preciso analizar el extremo 5' de la molécula en las almejas fina e italiana, con el fin de determinar posibles aminoácidos específicos de especie que permitieran determinar posibles péptidos específicos con los que inmunizar animales de experimentación para la obtención de anticuerpos.

V.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ALMEJAS BABOSA (*V. pullastra*), FINA (*R. decussatus*), ITALIANA (*R. philippinarum*) Y RUBIA (*V. rhomboides*) MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

De las técnicas de identificación de especies basadas en el análisis de proteínas que se citan en la introducción, las técnicas inmunológicas ELISA presentan una serie de ventajas con respecto a las técnicas electroforéticas y cromatográficas; constituyendo una opción interesante para la identificación de especies de pescado y marisco. Las técnicas de ELISA son métodos analíticos sencillos y eficaces, cuyos reactivos se pueden comercializar en forma de *kits* minituarizados (Sotelo y col., 1993). Si bien las técnicas genéticas son las más específicas y sensibles para la identificación de especies (Ferguson y col., 1995; Meyer y Candrian, 1996), su puesta a punto en un laboratorio de análisis requiere una cierta infraestructura, tanto de equipamiento, como de personal cualificado. Las técnicas inmunológicas, por el contrario, son más baratas y requieren menor equipamiento. La puesta a punto de inmunoensayos, en concreto de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), constituye por tanto una alternativa interesante para la identificación de especies a nivel de campo (Shepard y Hartmann, 1996; Carrera y col., 1997).

Las técnicas de ELISA se han aplicado a la identificación de diversas especies de pescado y marisco, entre los que se incluyen el camarón (*Sicyonia brevirostris*) (An y col., 1990), lubina americana (*Morone saxatilis*) (Schill y Dorazio, 1990), cangrejo rojo (*Lutjanus campechanus*) (Huang y col., 1995), sardina (*Sardina pilchardus*) (Taylor y Jones, 1992b), pez vela del Atlántico (*Istiophorus albicans*) (Shepard y Hartmann, 1996), salmón (*Salmo salar*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y palometa (*Brama raii*) ahumadas (Carrera y col. 1996; 1997), peces planos como lenguado (*Solea solea*), solla (*Pleuronectes platessa*), platija (*Platichthys flesus*), y fletán (*Reinhardtius hippoglossoides*) (Céspedes y col., 1999c) y la detección de carne de cangrejo en productos elaborados a partir del surimi (Verrez-Bagnis y Escriche-Roberto, 1993).

No obstante, la aplicación de las técnicas inmunológicas a la identificación de especies de productos marinos no está tan generalizada como en la carne y productos cárnicos (Hernández y col., 1994; Smith, 1995; Chen y col., 1998), o la leche y productos lácteos (García y col., 1991; Anguita y col., 1995), ya que la obtención de anticuerpos específicos es más compleja debido a la gran variedad de especies comercializadas y a las estrechas relaciones filogenéticas existentes entre éstas (Bossier, 1999).

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado y puesto a punto diversas técnicas inmunoenzimáticas para la identificación de las especies de almejas de interés comercial en España: babosa (*V. pullastra*), fina (*R. decussatus*), italiana (*R. philippinarum*) y rubia (*V. rhomboides*), que se detallan a continuación.

V.2.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Todas las técnicas inmunológicas se basan en la reacción específica entre un antígeno (sustancia que se quiere analizar) y su correspondiente anticuerpo. Los anticuerpos policlones proceden de una población heterogénea de linfocitos B productores de muchos tipos de anticuerpos, de afinidad y especificidad variable. Los anticuerpos monoclonales, por el contrario, presentan una respuesta uniforme y reproducible frente al antígeno empleado en su obtención, por lo que confieren una elevada especificidad, reproducibilidad y sensibilidad a los ensayos en que se utilizan (Pellón y

Hernández, 1987). Por otra parte, un inmunosuero policlonal se puede purificar, eliminando así aquellas poblaciones de anticuerpos que disminuyen la especificidad del inmunoensayo (Lee y Morgan, 1993). Por ello, los anticuerpos policlonales resultan más adecuados para ciertas necesidades.

Las características de los anticuerpos obtenidos dependen principalmente del antígeno utilizado como inmunógeno, de la especie de animal empleada para la obtención de los inmunosueros y de la pauta de inmunización.

Para la obtención de inmunosueros útiles en la identificación de especies se pueden emplear diversas fracciones proteicas. En el caso de productos no sometidos a tratamiento térmico, se han empleado como inmunógenos las proteínas séricas o las sarcoplásmicas (Buchmann y Pedersen, 1994; Oberst y col., 1996; Dominguez y col., 1997; Paugam y col., 2000). Por otra parte, en productos tratados por calor se han utilizado como inmunógenos las proteínas solubles extraídas de dichos productos (Taylor y Jones, 1992b; Carrera y col., 1996), o bien, proteínas termoestables especie-específicas (An y col., 1990; Huang y col., 1995). En este trabajo, se ha optado por utilizar como extractos antigénicos una mezcla de proteínas solubles obtenidas a partir de las especies de almejas babosa (PSB), fina (PSF), italiana (PSI) y rubia (PSR) (ver sección III.3.1.1.).

A la hora de seleccionar la especie animal que se va a utilizar para la producción de anticuerpos hay que tener en cuenta diversos factores como la distancia filogenética con la especie de la que procede el antígeno, la disponibilidad de un número suficiente de animales y la facilidad de manejo. Las especies más utilizadas para la obtención de anticuerpos son conejo, cobaya, rata y ratón (Harlow y Lane, 1999), aunque el empleo de animales de mayor tamaño como cerdos, carneros, machos cabríos o caballos, permite obtener grandes volúmenes de inmunosuero y durante períodos de tiempo más prolongados. La mayoría de los protocolos de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales contemplan el empleo de conejos, cabras u ovejas. En este trabajo, los anticuerpos policlonales se produjeron en conejos de la raza *Nueva Zelanda*, debido a que son animales de fácil manejo y mantenimiento, responden bien a una gran variedad de antígenos (Dunbar y

Schwoebel, 1990) y permiten obtener un volumen de suero suficiente para los objetivos propuestos.

Los conejos se inmunizaron con los extractos antigénicos PSB, PSF, PSI y PSR, emulsionados con adyuvante de Freund, alternándose inoculaciones intradérmicas e intramusculares (*Tabla 18*). El adyuvante se define como una sustancia que potencia la respuesta inmune de una manera inespecífica (Audibert y Lise, 1993). El mecanismo de acción de los adyuvantes es complejo e incluye una liberación lenta y prolongada del antígeno en una forma agregada, así como una activación de los linfocitos por componentes bacterianos (Hui, 1994). En concreto, el adyuvante completo de Freund se compone de células de *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas por calor y vehiculadas en aceite de parafina y monooleato. El aceite mineral impide la dispersión y retarda el catabolismo del antígeno, proporcionando una fuente de estimulación antigénica prolongada. Por el contrario, el adyuvante incompleto de Freund carece de células de *M. tuberculosis*. A su vez, con las inoculaciones intradérmicas se consigue una liberación del antígeno a la sangre del animal lenta y prolongada en el tiempo, mientras que en las inoculaciones intramusculares, la respuesta del sistema inmunológico del animal ante el antígeno es más rápida y menos duradera (Deshpande, 1996). Cuando el título del inmunosuero se consideró adecuado, los conejos se sacrificaron, obteniéndose aproximadamente 400 mL de sangre de cada animal.

Los inmunosueros resultantes del sacrificio de los animales, se purificaron parcialmente mediante precipitación selectiva con sulfato amónico. (ver sección III.3.2.4.). La precipitación selectiva de las inmunoglobulinas con sulfato amónico es el método más utilizado para la separación de las proteínas en solución y, en particular, para la separación de los anticuerpos o inmunoglobulinas del inmunosuero total. Esta técnica consiste en añadir un tampón que contiene elevadas concentraciones de iones fuertemente cargados, como el amonio y el sulfato, a una solución en la que las proteínas se encuentran unidas a las moléculas de agua formando puentes de hidrógeno. Los iones de amonio y sulfato compiten con las moléculas proteicas por el agua, y las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua,

disminuyen su solubilidad y precipitan. La precipitación selectiva con sulfato amónico minimiza las interacciones inespecíficas entre los anticuerpos y determinados metabolitos o sustancias cuya configuración molecular superficial sea semejante a la de los epítomos del antígeno a analizar. Por otra parte, se trata de una técnica sencilla, económica y aplicable a volúmenes grandes de suero, pudiéndose purificar y concentrar anticuerpos de cualquier especie. Además, la molaridad de la solución saturada de sulfato amónico es suficientemente elevada como para producir la precipitación de casi todas las proteínas, a las que protege frente a la desnaturalización, previniendo además el crecimiento microbiano (Harlow y Lane, 1988).

V.2.1.1. VALORACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS Y TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PLACA

Los inmunosueros obtenidos frente a los extractos antigénicos de proteínas solubles de almeja babosa (anti-PSB), fina (anti-PSF), italiana (anti-PSI) y rubia (anti-PSR), se analizaron mediante la técnica de ELISA indirecto con sus respectivos antígenos (PSB, PSF, PSI y PSR). Los resultados demostraron que los inmunosueros reconocían de manera similar el antígeno frente al cual se habían producido y a los antígenos de las especies heterólogas (*Tabla 22*).

La reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR era de esperar, debido a que la relación filogenética entre las especies de almejas estudiadas es muy estrecha, y muchos de los determinantes antigénicos de las proteínas extraídas pueden ser comunes en las cuatro especies de almejas analizadas. Teniendo en cuenta que los extractos antigénicos utilizados para la inmunización contenían todas las proteínas solubles extraídas de las muestras de almejas, los conejos no sólo produjeron anticuerpos especie-específicos, sino también frente a aquellos epítomos que presentan características comunes en las cuatro especies. Por esta razón, antes de ser utilizados para la identificación de especies, se debían eliminar los anticuerpos inespecíficos de los inmunosueros. La eliminación de reacciones cruzadas se puede realizar mediante técnicas de cromatografía de afinidad o mediante técnicas de inmunoabsorción (Harlow y Lane, 1999).

La purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad consiste en hacer pasar los inmunosueros por columnas que contienen como ligandos de afinidad las proteínas heterólogas con las que se producen reacciones cruzadas, recogiendo así los anticuerpos específicos en una última columna que contiene las proteínas de la especie frente a la que se obtuvo el inmunosuero (Harlow y Lane, 1988). Esta técnica se ha utilizado con éxito en nuestro laboratorio para conseguir anticuerpos especie-específicos frente a proteínas cárnicas (Martín y col., 1991) y lácteas (García y col., 1991).

Como alternativa a la cromatografía de afinidad se puede recurrir a la técnica de inmunoadsorción, que consiste en mezclar los inmunosueros con los extractos antigénicos de las especies heterólogas con el fin de bloquear los anticuerpos que reconozcan epítomos en dichos extractos, manteniéndose activos los anticuerpos frente a determinantes antigénicos específicos (Durand y col., 1974; Doberstein y Greuel, 1982). Una vez que se neutralizan los inmunosueros para eliminar las reacciones cruzadas, los complejos antígeno-anticuerpo que se forman durante la neutralización no interfieren en el ensayo inmunoenzimático, ya que se eliminan, junto con los anticuerpos no reaccionantes del inmunosuero, al lavar los pocillos de las placas de ELISA.

Esta técnica es más sencilla y económica que la cromatografía de afinidad, y se ha utilizado con éxito para la identificación específica de especies de pescado. Así, Taylor y col. (1992b) mediante la técnica de inmunoadsorción, eliminaron las reacciones cruzadas de los anticuerpos policlonales producidos frente a las proteínas musculares de sardina (*Sardina pilchardius*). Dichos autores, compararon las dos técnicas de purificación de anticuerpos anteriormente expuestas y llegaron a la conclusión que la técnica de inmunoadsorción es más sencilla, barata y además, proporciona mejores resultados que la técnica de cromatografía de afinidad. Del mismo modo, Carrera y col. (1996) y Céspedes y col. (1999c), utilizaron la técnica de inmunoadsorción para eliminar las reacciones cruzadas de los sueros policlonales obtenidos frente a extractos musculares de diversos salmónidos ahumados y pescados planos, respectivamente. Domínguez y col. (1997), consiguieron eliminar de un inmunosuero frente a proteínas solubles de halibut, las reacciones cruzadas con las proteínas del lenguado, mediante adsorción

del inmunosuero anti-halibut con proteínas de lenguado inmovilizadas en glutaraldehído. En moluscos, también se ha aplicado esta técnica para la identificación de individuos adultos y larvas de la especie de vieira *Pecten maximus* (Paugam y col., 2000). Estos investigadores eliminaron las reacciones cruzadas del suero policlonal anti-vieira, empleando extractos proteicos de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*).

En este trabajo, las reacciones cruzadas de los inmunosueros policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR frente a especies heterólogas, se eliminaron mediante la técnica de inmunoadsorción. Para ello, se añadieron diferentes cantidades de cada uno de los extractos proteicos heterólogos (sección III.3.2.5.), hasta comprobar la eficacia de la neutralización (Tabla 23).

Los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR una vez neutralizados, se emplearon en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para identificar dichas especies de almejas. Para diseñar el inmunoensayo, es preciso elegir el formato y método más adecuados que se ajusten a las necesidades de uso. El inmunoensayo más utilizado consiste en la unión a un soporte sólido, bien de la muestra antigénica, o bien del anticuerpo que se utiliza en su detección (Rittenburg y Grothaus, 1992). Una de las ventajas del empleo de un soporte sólido es que permite separar fácilmente los antígenos y anticuerpos unidos por reacciones específicas de aquéllos que no interaccionan y, por tanto, permanecen libres en la disolución. Esta separación se consigue de forma sencilla con lavados intermedios de la placa, proceso que se puede automatizar para una mayor comodidad (Deshpande, 1996).

El formato de ELISA empleado en este trabajo, ELISA indirecto, se considera menos preciso que los formatos de ELISA competitivo o *sandwich* (Levieux y Venien, 1994). La menor sensibilidad de este formato se debe a que la superficie de la placa se tapiza con muestras biológicas complejas, que además de contener el antígeno de interés incluyen un número elevado de otras moléculas. Sin embargo, en las técnicas del ELISA *sandwich* y ELISA competitivo se utilizan anticuerpos o antígenos de gran pureza, lo que disminuye las interferencias que afectan a la capacidad de detección del

anticuerpo, y por consiguiente, mejora la reproducibilidad y especificidad del inmunoensayo.

No obstante, el empleo de anticuerpos policlonales neutralizados, minimiza las reacciones cruzadas entre los anticuerpos y los componentes inespecíficos que pueda haber en las muestras. Este hecho, permite emplear con éxito la técnica de ELISA indirecto para la detección de un antígeno en una muestra problema, principalmente cuando el objetivo del ensayo no consiste en la cuantificación precisa del compuesto analizado (Harlow y Lane, 1999). Para el objetivo propuesto en este trabajo, la técnica del ELISA indirecto resultó ser la más adecuada, ya que es la más sencilla y rápida de las técnicas inmunoenzimáticas en cuanto a la obtención y preparación de los reactivos utilizados y al desarrollo del análisis.

Previamente al análisis de las muestras, los extractos antigénicos procedentes de cada muestra de almeja objeto de estudio se trataron a 70°C durante 5 min, utilizando para el análisis los sobrenadantes obtenidos tras una breve centrifugación (ver sección III.3.3.). Este tratamiento se realizó debido a que al utilizar en el ELISA indirecto los extractos antigénicos sin tratar, se obtuvieron absorbancias a 405 nm comprendidas entre 0,4-0,6 en los controles negativos sin anticuerpo. Sin embargo, con el tratamiento térmico y la posterior centrifugación de los extractos antigénicos, se eliminaron estos falsos positivos y se obtuvieron resultados satisfactorios en los controles negativos, es decir, absorbancias a 405 nm menores o iguales a 0,2. Este fenómeno puede tener su explicación en que los extractos proteicos solubles obtenidos a partir de las almejas, pueden arrastrar también ciertos polisacáridos u otros compuestos tisulares que se unan inespecíficamente al conjugado, dando lugar a falsos positivos al enfrentar los extractos antigénicos sin tratar, al conjugado y el sustrato. Además, ciertos investigadores sugieren que el tratamiento de las muestras, ya sea mediante ahumado o incluso esterilización, puede dar lugar a que aparezcan ciertos determinantes antigénicos que no quedan convenientemente expuestos en la proteína nativa. Así, Breton y col. (1988) obtuvieron anticuerpos frente a la ovoalbúmina, y demostraron que la afinidad de los anticuerpos purificados era mayor en la ovoalbúmina desnaturalizada por calor que en la proteína en estado nativo. Verrez-Bagnis y Escriche-

Roberto (1993) obtuvieron anticuerpos policlonales frente a la enzima arginina quinasa, con el fin de detectar mediante la técnica de ELISA directo carne de cangrejo en productos elaborados a partir de surimi esterilizado a 120°C durante 45 min. Estos autores llegaron a la conclusión de que en la enzima arginina quinasa desnaturalizada por calor, aparecen nuevos epítomos que no pueden ser detectados en la proteína en estado nativo. Por el contrario, Robin y col. (1976) demostraron que la arginina quinasa de la langosta y la creatina quinasa del conejo presentaban reacciones cruzadas tras una fuerte desnaturalización, debido a que el tratamiento térmico también puede dar lugar a la aparición de zonas conservadas de las secuencias proteicas. En este trabajo, la aplicación a los extractos proteicos de un ligero tratamiento térmico y la posterior centrifugación de las muestras, permitieron la eliminación de compuestos precipitados que interferían en los controles negativos de la técnica de ELISA.

Los resultados obtenidos en la técnica de ELISA indirecto (*Tabla 23*) muestran que los inmunosueros anti-PSB, anti-PSF y anti-PSR neutralizados reconocieron solamente a los extractos antigénicos de las especies de almejas frente a los cuales se produjeron. Sin embargo, al neutralizar el inmunosero policlonal frente a la especie de almeja italiana (anti-PSI), no se mejoró la especificidad del inmunosero frente a dicha especie. Esto puede indicar que los extractos proteicos de almeja italiana dieron lugar en los conejos a un suero policlonal en el que la mayoría de los anticuerpos reconocen determinantes antigénicos compartidos en las cuatro especies de almejas, ya que, como se ha indicado, estas especies son filogenéticamente muy cercanas.

Taylor y Jones (1994a), obtuvieron un resultado similar y no consiguieron eliminar con ninguna técnica de purificación la reactividad cruzada de los inmunosueros policlonales producidos frente a diversos túnidos enlatados.

Cabe destacar, que las técnicas de purificación de anticuerpos reducen significativamente la reactividad de los inmunosueros frente a los antígenos de interés (Carrera y col., 1996; Domínguez y col., 1997). En este trabajo, se observó que con la dilución 1:100 (anti-PSB y anti-PSR) y la dilución 1:300 (anti-PSF) de los anticuerpos policlonales frente a sus correspondientes

extractos antigénicos, se obtuvo una medida de absorbancia de 2,356 para los anticuerpos anti-PSB, 2,089 para anti-PSF y 2,168 con el inmunosero policlonal anti-PSR. Sin embargo, al neutralizar estos inmunoseros policlonales mediante la técnica de inmunoadsorción y eliminar los anticuerpos que reconocen determinantes antigénicos en las otras especies de almejas, los valores de absorbancia disminuyeron hasta 0,807 para los anti-PSB, 1,021 para anti-PSF y 0,950 para los anti-PSR (*Tabla 23*). Esto supone una reducción de la actividad del 65% para los anticuerpos específicos de la almeja babosa (anti-PSB), 51% para los anticuerpos específicos de la almeja fina (anti-PSF), y 54% para los anticuerpos específicos de la almeja rubia (anti-PSR). A pesar de esta disminución de la actividad, los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF y anti-PSR, permitieron la identificación específica de las especies de almejas babosa, fina y rubia.

En este trabajo, se analizaron 20 muestras de diversas procedencias de cada una de las especies de almejas estudiadas, frente a los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR neutralizados. En todas las muestras de almejas babosa, fina y rubia, se consiguió identificar el origen específico de las mismas. En consecuencia, se puede afirmar que la técnica de ELISA indirecto desarrollada en este trabajo utilizando anticuerpos policlonales frente a las proteínas solubles de las almejas babosa, fina y rubia, es un procedimiento adecuado para el reconocimiento específico de dichas especies de almejas, ya que se trata de una técnica sencilla, específica y barata.

V.2.1.2. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS

Actualmente la industria alimentaria tiene la necesidad de encontrar métodos analíticos rápidos, económicos, sencillos y sensibles. Por este motivo, tras la puesta a punto de la técnica de ELISA indirecto en placa para la identificación de las especies de almejas babosa, fina y rubia, se preparó un formato de ELISA en paletas, con el fin de adaptar el ensayo como prueba de campo. La técnica de ELISA en paletas desarrollada en este trabajo se basó en el protocolo experimental descrito por Skerritt y Hill (1991), para la detección de gluten en alimentos para enfermos celíacos. Las principales diferencias entre la técnica de ELISA indirecto en placas y la de ELISA indirecto en paletas afectan al soporte de la reacción antígeno-anticuerpo. En lugar de utilizar los pocillos

de las placas de poliestireno, la reacción inmunológica en la técnica de ELISA en paletas se desarrolla en unas paletas de poliestireno que se introducen en unos tubos de polipropileno (*Figura 41*). Además, los lavados se realizan con agua del grifo en sustitución de tampones de lavado, se disminuyen los tiempos de incubación de cada uno de los reactivos y las incubaciones se realizan a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción positiva se identifica visualmente, por el color azul desarrollado tras la degradación del sustrato por la enzima (*Figura 80*). Todas estas características permiten que el análisis se pueda llevar a cabo en menos de dos horas y en cualquier lugar, ya que no es necesario disponer de ningún tipo de equipamiento especial.

La técnica de ELISA en paletas desarrollada en este trabajo permitió identificar visualmente y de forma inequívoca todas las muestras de las especies de almejas babosa, fina y rubia (*Figura 80*). Teniendo en cuenta las ventajas anteriormente expuestas, la técnica de ELISA indirecto en paletas resulta muy apropiada en programas oficiales de control e inspección del etiquetado de productos marinos *in situ*, en aduanas, lonjas y empresas de transformación, con el fin de evitar el posible fraude por sustitución de especies.

Conviene señalar que las técnicas de ELISA indirecto en placas y en paletas desarrolladas en este trabajo son las primeras técnicas de identificación de almejas de interés comercial basadas en el análisis de proteínas y, por sus características y formato, pueden resultar muy útiles para el control del correcto etiquetado y comercialización de estos productos. Mientras que la técnica de ELISA en paletas resulta más adecuada como prueba de campo, la de ELISA indirecto en placa permite analizar simultáneamente un mayor número de muestras problema.

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos en este trabajo y del interés de las técnicas descritas en programas de inspección y control de calidad de productos del mar, ambas técnicas se basan en la utilización de anticuerpos policlonales. Los principales inconvenientes en la utilización de este tipo de anticuerpos son: (1) disponibilidad limitada de los mismos, y (2) la necesidad de purificarlos con el fin de eliminar reacciones cruzadas y que posean especificidad adecuada. Estos inconvenientes, se pueden resolver con

el empleo de la tecnología de obtención de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975), con la cual se pueden obtener de forma continuada e ilimitada anticuerpos monoclonales, cuya principal característica es su especificidad. Sin embargo, la obtención de anticuerpos monoclonales es más cara, laboriosa y delicada que la obtención de anticuerpos policlonales y, con frecuencia, los anticuerpos policlonales presentan una mayor avidez por el antígeno, por lo que la producción de anticuerpos monoclonales no se justifica en todos los casos (Harlow y Lane, 1999).

V.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA ALMEJA FINA (*R. decussatus*)

La principal ventaja en la obtención de anticuerpos monoclonales es que permite immortalizar "*in vitro*" clones de linfocitos B que producen cantidades ilimitadas de anticuerpos químicamente idénticos (Lee y Morgan, 1993). Además, los anticuerpos monoclonales presentan una respuesta uniforme y reproducible frente a la molécula antigénica empleada en su obtención y, por ello, tienen un gran valor en el desarrollo de ensayos de diagnóstico, a los que confieren gran especificidad, reproducibilidad y sensibilidad (Pellón y Hernández, 1987; Noah y col., 1996).

Las principales diferencias entre la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales para el desarrollo de *kits* comerciales incluyen (Hansen, 1990):

- Los anticuerpos policlonales proceden de una población heterogénea de linfocitos B productores de muchos tipos de anticuerpos, de afinidad y especificidad variable. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales proceden en su origen de un solo linfocito, y reconocen un único epítipo en la molécula antigénica. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales presentan una respuesta uniforme y reproducible frente al determinante antigénico empleado en su obtención, lo que hace que sean altamente específicos, reproducibles y sensibles los ensayos en que se utilizan.
- La obtención de anticuerpos policlonales se lleva a cabo en pocos meses, y requiere la inmunización de los animales y el mantenimiento de los mismos. Sin embargo, para la obtención de anticuerpos monoclonales se requiere por lo general un período de tiempo mayor, así como el

mantenimiento de los cultivos celulares y la producción de hibridomas, por lo que su producción resulta bastante costosa.

- Se requieren repetidas inmunizaciones y la utilización de nuevos animales para la obtención de anticuerpos policlonales, por lo que aumenta la variabilidad en cuanto a especificidad y afinidad de los anticuerpos. Por el contrario, una vez que se obtiene un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales específicos frente al determinante antigénico objeto de estudio, se puede disponer de una cantidad ilimitada de anticuerpos de especificidad y afinidad homogénea.

Al igual que en la obtención de anticuerpos policlonales, para la obtención de anticuerpos monoclonales hay que tener en cuenta una serie de premisas, como el protocolo de inmunización y la especie empleada como donante de linfocitos, ya que son dos factores importantes para conseguir fusiones celulares efectivas (Spitz y col., 1984). No obstante, hay que considerar también en la inmunización de los animales el número y frecuencia de las inmunizaciones, la cantidad de antígeno que se va a emplear en la inmunización, y la ruta y tipo de adyuvantes empleados (Rittenburg, 1990). Los adyuvantes utilizados en este trabajo, fueron los mismos que los empleados para la obtención de anticuerpos policlonales. Sin embargo, para la obtención de anticuerpos monoclonales, el ratón es el animal de elección debido a su fácil manejo y a que responde a concentraciones inferiores de antígeno. Se prefiere la inmunización de ratones de la estirpe Balb/c, ya que tiene un período de gestación corto (21 días) y alcanzan rápidamente la madurez sexual (6 semanas).

En este trabajo, la inmunización de ratones Balb/c se realizó mediante administración intraperitoneal de los extractos proteicos procedentes de almeja fina, por ser ésta la especie de mayor valor económico. Se inmunizaron dos lotes de ratones, uno con extractos proteicos liofilizados (Lote 1) y otro sin liofilizar (Lote 2). Utilizando la técnica de ELISA indirecto, los valores de absorbancia obtenidos confirmaron que la concentración de anticuerpos en el suero aumentaba a medida que se repetía la administración del antígeno. Las inoculaciones repetidas del antígeno no sólo producen elevadas concentraciones de los anticuerpos en el inmunosuero, sino que da lugar a que

se establezca una competencia entre los linfocitos B. Como resultado de esta selección, se establece una supremacía de un limitado número de clones de linfocitos productores de anticuerpos que se caracterizan por su elevada afinidad por la molécula antigénica (Harlow y Lane, 1988). Además, con el suero obtenido en las sangrías parciales se determinó el título de anticuerpos para identificar los animales con un mayor grado de inmunización y, por lo tanto, los más idóneos para proceder a la producción de anticuerpos monoclonales. Aplicando este criterio se seleccionaron 3 ratones de cada lote para realizar las fusiones, los cuales recibieron una dosis adicional de inmunógeno 2-4 días antes de la fusión para mantener su nivel de inmunización.

Algunos autores han desarrollado otra técnica de inmunización que consiste en inocular el antígeno directamente en el bazo, evitando así las inoculaciones sucesivas del antígeno (Spitz y col., 1984; Gearing y col., 1985). Sin embargo, los resultados obtenidos con esta técnica de inmunización, demuestran que la concentración de los anticuerpos en el suero es menor que la de los inmunosueros obtenidos en ratones inmunizados intraperitonealmente (Gearing y col., 1985). Cabe destacar que con el método de inoculación intraesplénica se requiere la utilización de concentraciones muy pequeñas de antígeno (20 μ g) para alcanzar una concentración adecuada de anticuerpos, y éstos presentan una mayor especificidad por el antígeno.

Existen muchos protocolos de inmunización, pero en general no se recomienda acortar demasiado los intervalos de tiempo existentes entre dos inoculaciones sucesivas, ya que esto supondría la rápida destrucción del antígeno por los anticuerpos circulantes. Por este motivo, de acuerdo con la pauta de inmunización descrita en el apartado III.3.5.1., los ratones se inmunizaron cada 2-3 semanas.

Por lo que se refiere a la fusión celular, el recuento de linfocitos esplénicos en los ratones inmunizados (entre $1,2 \times 10^8$ y 9×10^8), fue superior al número esperado en el bazo de un ratón (aproximadamente 10^8), una circunstancia que es relativamente habitual cuando se emplea el adyuvante de Freund en la inmunización de los animales (Goding, 1996). Sin embargo, la eficiencia del proceso de fusión es baja, ya que en las fusiones celulares más

eficaces, sólo un 1% de las células presentes originariamente se fusionan y sólo 1 de cada 10^5 produce hibridomas viables. En teoría, la fusión celular puede ocurrir espontáneamente, pero esto es poco frecuente por lo que se requiere la utilización de agentes que promuevan la fusión celular, tales como el virus Sendai, lisolecitina o polietilen-glicol (PEG). En este trabajo, se empleó para las fusiones el PEG, que es el método más utilizado en la producción de hibridomas, permitiendo una alta reproducibilidad y frecuencia de fusión. Además el PEG es entre 100 y 300 veces más eficaz que el virus Sendai, incrementando la frecuencia de híbridos viables (Goding, 1996). Una vez fusionados los linfocitos con las células de mieloma, la mezcla celular se resuspendió en el medio HT-CRPMI complementado con BM-Condimed H1 y se distribuyó en placas de 96 pocillos.

La fusión es una de las etapas más delicadas en el protocolo de obtención de anticuerpos monoclonales. Existen diversas circunstancias que pueden impedir una correcta fusión entre linfocitos y células de mieloma, generalmente relacionadas con el empleo de PEG, ya sea por la excesiva dilución del mismo, toxicidad para los linfocitos de algunos lotes de PEG, contacto demasiado prolongado entre las células y el PEG, etc. (Goding, 1996). No obstante, en nuestro caso se consideró que la eficiencia de fusión fue máxima, ya que la mayoría de los pocillos contenían hibridomas viables.

Para la selección de hibridomas productores de anticuerpos específicos, se pueden considerar una gran variedad de métodos, pero como norma general, debe elegirse el mismo método para el que vaya a ser utilizado el anticuerpo monoclonal y, si es posible, usar procedimientos que permitan analizar grandes cantidades de muestra. En este sentido, los métodos más utilizados son el enzaimunoensayo (ELISA) o el radioinmunoensayo (RIA) si se requiere una alta sensibilidad, la inmunofluorescencia si conviene localizar una determinada estructura celular, y la inmunoadsorción en papel de nitrocelulosa, para la identificación de anticuerpos monoclonales específicos frente a una proteína con una masa molecular definida dentro de una mezcla compleja. En nuestro caso, utilizamos como método de selección un ELISA indirecto, enfrentando los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas al extracto proteico obtenido a partir de la almeja fina (PSF).

Tras la realización del ELISA indirecto, se identificaron los pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos que reconocían a la almeja fina, seleccionándose los pocillos cuya absorbancia a 405 nm fue superior a 1,0. Posteriormente, se procedió a la selección de hibridomas que produjeran anticuerpos monoclonales específicos frente a la almeja fina, pero que no reconocieran a las especies de almejas heterólogas (babosa, italiana y rubia). Teniendo en cuenta las premisas descritas en el apartado IV.2.3., se realizó la técnica ELISA indirecto de diferenciación, en el que se enfrentaron cada uno de los extractos proteicos procedentes de las especies de almejas babosa (PSB), fina (PSF), italiana (PSI) y rubia (PSR), al sobrenadante de cada pocillo seleccionado mediante la técnica de ELISA indirecto. Se consideraron pocillos productores de anticuerpos específicos frente a la almeja fina, aquellos cuya absorbancia a 405 nm fuera 1,0 o superior a las absorbancias obtenidas en las otras tres especies heterólogas, y las absorbancias frente a las almejas babosa, italiana y rubia fueran similares a las de los controles negativos ($\leq 0,2$). Sin embargo, a pesar de que el nivel de inmunización de los animales, número de linfocitos obtenidos y la eficacia de la fusión, parecían favorables para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la almeja fina, no se pudieron seleccionar pocillos con hibridomas productores de anticuerpos completamente específicos anti-PSF.

Otro factor que puede interferir en la selección de los hibridomas productores de los anticuerpos de interés, es el empleo de un formato de inmunoensayo inadecuado para la detección de los anticuerpos en los sobrenadantes. Este hecho, podría impedir la identificación y clonación rápida de los hibridomas de interés y aumentaría el riesgo de que fueran enmascarados por otros hibridomas, no secretores, presentes en el mismo pocillo. Sin embargo, con los sobrenadantes de los pocillos con los que se obtuvieron los mejores resultados, se ensayaron otras técnicas de ELISA como el ELISA *sandwich* (sección III.3.5.4.), con el que no se mejoraron los resultados respecto al ELISA indirecto; por lo que se optó por utilizar éste último como método de identificación de los hibridomas productores de anticuerpos de interés. Por lo tanto, el empleo de la técnica de ELISA indirecto para la selección e identificación de hibridomas productores de anticuerpos

específicos anti-PSF, en principio, no constituye una razón que justifique el resultado negativo obtenido.

Otro de los aspectos que puede dificultar la obtención de hibridomas productores de los anticuerpos de interés es la naturaleza antigénica de los extractos proteicos empleados en la inmunización. Al inmunizar un animal con extractos proteicos obtenidos a partir de una especie, es probable que la mayoría de los anticuerpos generados frente a dichos antígenos presenten determinantes antigénicos comunes a otras especies filogenéticamente cercanas. Por este motivo ciertos autores han preferido purificar determinadas proteínas específicas de la especie o especies de interés, con el fin de utilizarlas como antígenos para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales. Así, An y col. (1990), aislaron una proteína específica de la especie de camarón *Sicyonia brevirostris*, que denominaron *proteína M*, y la emplearon en la obtención de anticuerpos monoclonales frente a dicha especie. Rossi y col. (1992), purificaron la albúmina del suero del pez de vela del Atlántico (*Istiophorus albicans*) para la obtención de anticuerpos monoclonales, y comprobaron que 16 clones diferentes exhibían reacciones cruzadas frente a otras especies de pez espada (*Makaira nigricans* y *Tetrapturus albidus*). Sin embargo, 3 de estos clones fueron específicos frente a la especie *Istiophorus albicans*, uno de los cuales (el clon M2D1) se conjugó a la enzima peroxidasa de rábano para desarrollar un método rápido mediante ELISA *sandwich* que permitió la identificación inequívoca de dicha especie. De forma similar, Huang y col. (1995) purificaron la *proteína A* específica del cangrejo rojo (*Lutjanus campechanus*), con la que obtuvieron anticuerpos monoclonales.

En este trabajo, inmunizando ratones con extractos de proteínas totales de la almeja fina, no se obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a epítomos específicos de esta especie, ya que la mayoría de los clones positivos presentaron reacciones cruzadas frente a las especies de almejas relacionadas filogenéticamente: babosa, italiana y rubia. En consecuencia, sería preferible identificar y purificar proteínas específicas, o bien emplear péptidos sintéticos como se indica en la sección V.1.10., con los que inmunizar animales de experimentación para la obtención de anticuerpos que permitieran, mediante técnicas de ELISA, la detección rápida de dicha especie a nivel de campo. Sin

embargo, el estudio del gen que codifica la arginina quinasa en las cuatro especies de almejas analizadas no ha permitido identificar ningún péptido específico de almeja fina. A pesar de las diferencias detectadas en la secuencia del ARNm, la secuencia aminoacídica del fragmento analizado de la arginina quinasa es idéntica en almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja italiana (*R. philippinarum*).

Capítulo VI

CONCLUSIONES

1. La diferenciación genética de las almejas babosa (*Venerupis pullastra*), fina (*Ruditapes decussatus*), italiana (*Ruditapes philippinarum*) y rubia (*Venerupis rhomboides*), se ha llevado a cabo utilizando los marcadores genéticos α -actina, espaciador interno de la transcripción (ITS), arginina quinasa y 16S ARNr. Con los genes α -actina, ITS y 16S ARNr se amplificaron fragmentos génicos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La restricción de los fragmentos amplificados con las endonucleasas seleccionadas en este trabajo ha permitido diferenciar e identificar específicamente las almejas babosa, fina, italiana y rubia, mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Mediante esta técnica y con el marcador genético α -actina se han diferenciado las almejas babosa y fina, de la italiana y rubia. Con el espaciador interno de la transcripción se han identificado específicamente las almejas babosa, fina e italiana, y utilizando un fragmento del gen mitocondrial 16S ARNr se han identificado las cuatro especies de almejas seleccionadas en este trabajo.
2. Con el marcador genético α -actina, y mediante el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas del ADN (SSCP), se obtuvieron perfiles de bandas de ADN específicos que permitieron diferenciar las almejas babosa del resto de las especies analizadas sin necesidad de realizar una restricción enzimática.
3. Las secuencias aminoacídicas derivadas del ARN mensajero que codifican la enzima arginina quinasa se han estudiado mediante la técnica de RT-PCR, con el fin de identificar péptidos específicos de cada especie, con los que inmunizar animales de experimentación para obtener anticuerpos especie-específicos. El extremo 3' de dicha enzima presenta aminoácidos específicos de especie para las almejas babosa y rubia, mientras que las dos especies de almejas pertenecientes al género *Ruditapes* (fina e italiana) presentan idéntica secuencia aminoacídica en el fragmento estudiado.
4. La diferenciación inmunológica de las almejas babosa, fina y rubia se ha conseguido utilizando anticuerpos policlonales obtenidos frente a las proteínas solubles de las almejas babosa (anti-PSB), fina (anti-PSF) y rubia (anti-PSR). Estos anticuerpos policlonales, neutralizados con los extractos

antigénicos heterólogos, se han utilizado en las técnicas inmunoenzimáticas de ELISA para identificar específicamente las almejas babosa, fina y rubia.

Capítulo VII

TRABAJO FUTURO

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran la utilidad de las técnicas inmunológicas como métodos rápidos para la identificación de especies de almejas, aunque también han puesto de manifiesto algunas dificultades en la obtención de anticuerpos específicos de especie. En este contexto, la utilización de anticuerpos policlonales obtenidos frente a proteínas solubles de almeja babosa, fina y rubia (anti-PSB, anti-PSF y anti-PSR), han permitido la diferenciación de dichas especies mediante el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). Sin embargo, no se ha podido obtener un inmunosuero policlonal específico frente a la almeja italiana (anti-PSI). Por otra parte, la disponibilidad de anticuerpos policlonales está condicionada a su obtención *in vivo* a partir de animales de experimentación. Esta limitación induce a pensar en el empleo de anticuerpos monoclonales con el mismo fin. Por este motivo, se procedió a la obtención de anticuerpos monoclonales frente proteínas solubles de almeja fina (*R. decussatus*) ya que dicha especie es la que tiene mayor importancia comercial. Sin embargo, no fue posible obtener hibridomas productores de anticuerpos específicos anti-PSF.

Diversos investigadores han utilizado anticuerpos monoclonales para la diferenciación de especies de pescado y marisco (Rossi y col., 1992; Demers y col., 1993; Shepard y Hartmann, 1996). La obtención de anticuerpos monoclonales permite disponer de anticuerpos homogéneos de gran especificidad, secretados de manera ilimitada por un clon de hibridomas y que reconocen un único epítipo en la molécula antigénica. Por el contrario, los anticuerpos policlonales proceden de todos los clones de linfocitos implicados en la secreción de anticuerpos frente a los diferentes epítopos del antígeno.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales se pueden emplear como inmunógenos las proteínas musculares solubles de las especies de interés (Martín y col., 1988; Huang y col., 1995), aunque la utilización de inmunógenos más específicos contribuye a garantizar la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que diferencien especies filogenéticamente próximas. En este sentido, es posible emplear proteínas musculares específicas de cada especie (García y col., 1994) o péptidos sintéticos específicos de especie, seleccionados mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de determinadas proteínas de las especies de interés (Rolland y col., 1993; Martínez y col., 1998).

Otra consideración a tener en cuenta es que las proteínas están codificadas genéticamente por el ADN, por lo tanto la comparación y búsqueda de secuencias peptídicas específicas puede basarse en el estudio de secuencias de ADN o ARN mensajero disponibles en las bases de datos especializadas como *EMBL* o *GenBank*. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos proyectos para secuenciar y analizar el genoma completo de diversos eucariotas, como el genoma humano (McPherson y col., 2001), de ratón (*Mus musculus*) (Valero y col., 2000; Watters y Dietrich, 2001), de mosca (*Drosophila melanogaster*) (Rubin y col., 2000; Adams y col., 2000) y del nematodo *Candida elegans* (Blaxter y col., 1999), entre otros. Estos estudios contribuyen a que cada vez se disponga de mayor información genética de los diversos organismos y hacen posible la identificación de regiones del genoma con diversos grados de variabilidad genética. De esta forma, mediante estudios comparativos del ADN o ARN de diversos organismos se pueden localizar proteínas o péptidos con suficiente variabilidad interespecífica para diferenciar especies filogenéticamente próximas pero con escasa variabilidad intraespecífica.

De las numerosas proteínas inmunógenas que pueden presentar epítomos específicos de especie, en este proyecto se propone la utilización del extremo 5' de la arginina quinasa, la tropomiosina y la albúmina sérica.

Como se ha indicado en la Discusión, las fosfagen quinasa son enzimas que catalizan la transferencia reversible de los grupos fosfato entre el trifosfato de adenosina (ATP) y la guanina. Los animales vertebrados poseen únicamente fosfocreatina como fosfágeno por lo que su única fosfagen quinasa es la creatina quinasa, mientras que en los animales invertebrados existen otras fosfagen quinasa: arginina quinasa, glicociamina quinasa, taurociamina quinasa y lombricina quinasa. En esta Tesis Doctoral, se eligió la enzima arginina quinasa porque está ampliamente distribuida en invertebrados, y ha sido secuenciada en varias especies, incluyendo equinodermos (Suzuki y col., 1999), la anémona de mar *Anthopleura japonicus* (Suzuki y col., 1997a), crustáceos (Dumas y Camonis, 1993; Furukohri y col., 1994) y varios moluscos (Suzuki y Furukohri, 1994; Suzuki y col., 1997b; Suzuki y col., 1998). El extremo 3' de la arginina quinasa presenta aminoácidos específicos de especie para las almejas babosa y rubia. Sin embargo, las dos especies del género *Ruditapes* estudiadas presentan una secuencia

aminoacídica idéntica en el extremo 3' de la enzima (sección V.1.10). Por ello, sería conveniente analizar el extremo 5' de la molécula en las almejas fina e italiana, con el fin de determinar posibles aminoácidos específicos de especie que permitieran diseñar péptidos específicos con los que inmunizar animales de experimentación para la obtención de anticuerpos. La comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo pone de manifiesto la existencia de fragmentos específicos, pero también de fragmentos muy conservados que resultan adecuados para el diseño de cebadores universales con los que, mediante la técnica de RT-PCR, se pueden estudiar las secuencias aminoacídicas derivadas del ARN mensajero del extremo 5' en las almejas fina e italiana.

Otras proteínas interesantes en la obtención de anticuerpos monoclonales son las proteínas alergénicas. Se han identificado dos clases de proteínas, las parvoalbúminas y las tropomiosinas, como causantes de alergias alimentarias en el hombre por la ingestión de productos marinos. Las parvoalbúminas son las proteínas más alergénicas en especies de pescados como *Gadus callarias* (Elsayed y Aas, 1971), salmón *Salmo salar* (Lindstrøm y col., 1996), y *Trachurus japonicus* (Shiomi y col., 1998). Por el contrario, en tres especies de camarón *Penaeus indicus* (Shanti y col., 1993), *P. aztecus* (Daul y col., 1994) y *Metapenaeus ensis* (Leung y col., 1994) y en tres especies de moluscos, la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) (Ishikawa y col., 1998), el calamar *Todarodes pacificus* (Miyazawa y col., 1996) y el gastrópodo *Turbo cornutus* (Ishikawa y col., 1998), las proteínas más alergénicas son las tropomiosinas. En las bases de datos EMBL y Genbank se encuentran disponibles las secuencias nucleotídicas que codifican las tropomiosinas de moluscos como el mejillón (*Mytilus edulis*) (número de acceso U40035) y el gastrópodo *Haliotis rufescens* (X75218). En las regiones conservadas de estos genes se podrían diseñar cebadores universales y, mediante la técnica de RT-PCR analizar las secuencias aminoacídicas derivadas del ARN mensajero de las tropomiosinas de las almejas babosa, fina, italiana y rubia, para diseñar péptidos especie-específicos.

Capítulo VIII

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS, R., VERBEKE, R. y VAN HOOFF, J. (1984). Fish species identification by isoelectric focusing. **Fleischwirtschaft** 64, 597-598.
- ABUÍN, M., CLABBY, C., MARTÍNEZ, P., GOSWAMI, U., FLAVIN, F., WILKINS, N.P., HOUGHTON, J.A., POWELL, R. y SÁNCHEZ, L. (1996). A NOR-associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). **Genome** 39, 671-679.
- ADAMS, N.S., SPEARMAN, W.J., BURGER, C.V., CURRENS, K.P., SCHRECK, C.B. y LI, H.W. (1994). Variation in mitochondrial DNA and allozymes discriminates early and late forms of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in the Kenai and Kasilof rivers, Alaska. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 51, S172-S181.
- ADAMS, M.D., CELNIKER, R.A., HOLT, C.A., EVANS, J.D. y GOCAYNE, J.D. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287, 2271-2274.
- ALVARADO-BREMER, J.R., NASERI, I. y ELY, B. (1997). Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. **Journal of Fish Biology** 50, 540-554.
- ALLARD, M.W., MIYAMOTO, M.M., JARECHE, L., KRAUS, F. y TENNANT, M.R. (1992). DNA systematics and evolution of the artiodactyl family Bovidae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 89, 3972-3976.
- AN, H., MARSALL, M.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1988). Electrophoretic identification of raw and cooked shrimp using various protein extraction systems. **Journal of Food Science** 53, 313-318.
- AN, H., WEI, C.I., ZHAO, J., MARSALL, M.R. y LEE, C.M. (1989a). Electrophoretic identification of fish species used in surimi products. **Journal of Food Science** 54, 253-257.
- AN, H., MARSALL, M.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1989b). Species identification of raw and boiled shrimp by urea gel isoelectric focusing technique. **Journal of Food Science** 54, 233-236.

- AN, H., KLEIN, P.A., KAO, K., MARSALL, M.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1990). Development of monoclonal antibody for rock shrimp identification using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38, 2094-2100.
- ANDRÉ, C., LINDEGARTH, M., JOHSSON, P.R. y SUNDBERG, P. (1999). Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** 79, 563-565.
- ANGUITA, G., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., HAZA, A.I., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. (1995). Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine β -casein. **Journal of Dairy Research** 62, 655-59.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1995). AOAC Official Method 980.16. Identification of fish species. En: *Official Methods of Analysis*, 16^a ed. Washington D.C., EE.UU., vol. II. 35. 1. 41.
- AOYAMA, J., WATANABE, S., NISHIDA, M. y TSUKAMOTO, K. (2000). Discrimination of catadromous eels of genus *Anguilla* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA domain. **Transactions of the American Fisheries Society** 129, 873-878.
- ARMSTRONG, S.G., LEACH, D.N. y WYLLIE, S.G. (1992). The use of HPLC protein profiles in fish species identification. **Food Chemistry** 44, 147-152.
- ÁRNASON, E., PETERSEN, P.H. y PÁLSSON, S. (1998). Mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence variation of Atlantic cod, *Gadus morhua*, from the Baltic and the White Seas. **Hereditas** 129, 37-43.
- ASAKAWA, S., KUMAZAWA, T., ARAKI, T., HIMENO, H., MIURA, K. y WATANABE, K. (1991). Strand-specific nucleotide bias in echinoderm and vertebrate mitochondrial genomes. **Journal of Molecular Evolution** 32, 511-520.
- ASENSIO, I., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000). Identification of Nile Perch (*Lates*

- niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*) and Wrech fish (*Polyprion americanus*) by PCR-RFLP of a 12S rRNA gene fragment. **Journal of Food Protection** 63, 1248-1252.
- ASENSIO, I., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., CÉSPEDES, A., RODRÍGUEZ, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2001). Identification of Nile Perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*) and Wrech fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of AOAC International** 84, 777-781.
- ASHOOR, S.H. y KNOX, M.J. (1985). Identification of fish species by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography** 324, 199-202.
- AUDIBERT, F.M. y LISE, L.D. (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology Today** 14, 281-284.
- AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R.M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A. y SAUNDERS, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography, the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 489-522.
- BADARACCO, G., BARATELLI, L., GINELLI, E., MENEVERI, R., PLEVANI, P., VALSASNINI, P. y BARIGOZZI, C. (1987). Variations in repetitive DNA and heterochromatin in the genus *Artemia*. **Chromosoma** 95, 71-75.
- BAGSHAW, J.C. (1991). RFLP analysis of ribosomal RNA genes among species and populations of *Artemia*. **Journal of Cellular Biology** 115:90a.
- BAGSHAW, J.C. y BUCKHOLT, M.A. (1997). A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. **Gene** 184, 211-214.
- BALDWIN, B.S., BLACK, M., SANJUR, O., GUSTAFSON, R., LUTZ, R.A. y VRIJENHOEK, R.C. (1996). A diagnostic molecular marker for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and potentially co-occurring bivalves: mitochondrial COI. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 5, 9-14.
- BANKS, M.A., HEDGECOCK, D. y WATERS, C. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster spp. (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA

- sequences coding for large subunit rRNA. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 2, 129-136.
- BARDAKCI, F. y SKIBINSKI, D.O.F. (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish, species and subspecies identification. **Heredity** 73, 117-123.
- BARNES, K.W. (1995). An introduction to food analysis techniques. **Food Technology** 49, 47-50.
- BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1991). Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 48, 309-17.
- BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1992). FINS (forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. **Biotechniques** 12, 408-411.
- BEACHAM, T.D., WITHLER, R.E. y STEVEN, T.A. (1996). Stock identification of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using minisatellite DNA variation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 53, 380-394.
- BEACHAM, T.D. y DEMPSON, J.B. (1998). Population structure of Atlantic salmon from the Conne River, Newfoundland as determined from microsatellite DNA. **Journal of Fish Biology** 52, 665-676.
- BENTZEN, P. y WRIGHT, J.M. (1993). Nucleotide sequence and evolutionary conservation of a minisatellite variable number tandem repeat cloned from Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Genome** 36, 884-893.
- BIBB, M.J., VAN-ETTEN, R.A., WRIGHT, C.T., WALBERG, M.W. y CLAYTON, D.A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. **Cell** 26, 167-180.
- BIELAWSKI, J.P. y PUMO, D.E. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. **Heredity** 78, 32-40.
- BLAXTER, M., ASLETT, M., GUILIANO, D. y DAULB, J. (1999). Parasitic helminth genomics. **Parasitology** 118, S39-S51.

- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. y VAN DER NOORDAA, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology** march, 495-503.
- BOOM, J.D.G., BOULDING, E.G. y BECKENBACH, A.T. (1994). Mitochondrial DNA variation in introduced populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in British Columbia. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 51, 1608-1614.
- BOORE, J.L. y BROWN, W.M. (1994). Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. **Genetics** 138, 423-443.
- BOOTON, G.C., KAUFMAN, L., CHANDLER, M., OGUTO-OHWAYO, R., DUAN, W. y FUERST, P.A. (1999). Evolution of the ribosomal RNA internal transcribed spacer one (ITS-1) in cichlid fishes of the Lake Victoria region. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 11, 273-282.
- BORGIO, R., SOUTY-GROSSET, C., BOUCHON, D. y GOMOT, L. (1996). PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. **Journal of Food Science** 61, 1-4.
- BOS, J.L. (1989). Ras oncogens in human cancer: A review. **Cancer Research** 49, 4682-4689.
- BOSSIER, P. (1999). Authentication of seafood products by DNA patterns. **Journal of Food Science** 64, 189-193.
- BOSSIER, P. y COOREMAN, K. (2000). A databank able to be used for identifying and authenticating commercial flatfish (Pleuronectiformes) products at the species level using isoelectric focusing of native muscle proteins. **International Journal of Food Science and Technology** 35, 563-568.
- BOUCHON, D., SOUTY-GROSSET, C. y RAIMOND, R. (1994). Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. **Aquaculture** 127, 131-144.
- BOUDRY, P., HEURTEBISE, S., COLLET, B., CORNETTE, F. y GÉRARD, A. (1998). Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamark) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

- (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 226, 279-291.
- BOWDITCH, B.M., ALBRIGHT, D.G., WILLIAMS, J.G. y BRAUN, M.J. (1993). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. **Methods in Enzymology** 224, 294-309.
- BRETON, C., PHAN THANH, L. y PARAF, A. (1988). Immunochemical properties of native and heat denatured ovalbumin. **Journal of Food Science** 53, 222-224.
- BRINKLEY, P., BAUSTITA, D.S. y GRAHAN, F.L. (1991). The cleavage site of restriction endonuclease *Mnl* I. **Gene** 100, 267-268.
- BROCK, V. y CHRISTIANSEN, G. (1989). Evolution of *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *Cardium lamarcki* and *Cardium glaucum* – studies of DNA variation. **Marine Biology** 102, 505-511.
- BROOKER, A.L., COOK, D., BENTZEN, P., WRIGHT, J.M. y DOYLE, R.W. (1994). Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 51, 1959-1966.
- BROWN, W.M., GEORGE, M. y WILSON, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 76, 1967-1971.
- BROWN, W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. MacIntyre, R.J. (ed.), Plenum Press, New York, 95-130.
- BROWNIE, J., SHAWCROSS, S., THEAKER, J., WHITCOMBE, D., FERRIE, R., NEWTON, C. y LITTLE, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. **Nucleic Acids Research** 25, 3235-3241.
- BUCHMANN, K. y PEDERSEN, K. (1994). A study on teleost phylogeny using specific antisera. **Journal of Fish Biology** 45, 901-903.
- BUCKLIN, A., FROST, B.W. y KOCHER, T.D. (1995). Molecular systematics of six *Calanus* and three *Metridia* species (Calanoida: Copepoda). **Marine Biology** 121, 655-664.

- BUNTJER, J.B., LENSTRA, J.A. y HAAGSMA, N. (1995). Rapid species identification by using satellite DNA probes. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 201, 577-582.
- BUNTJER, J.B., LAMINE, A., HAAGSMA, N. y LENSTRA, J.A. (1999). Species identification by oligonucleotide hybridization: the influence of processing on meat products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 79, 53-57.
- BURGENER, M. y HÜBNER, P. (1998). Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 207, 261-263.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J. y GRESSHOFF, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology** 9, 553-557.
- CANAPA, A., MAROTA, I., ROLLO, F. y OLMO, E. (1996). Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): Comparison of molecular and palaeontological data. **Journal of Molecular Evolution** 43, 517-522.
- CANAPA, A., MAROTA, I., ROLLO, F. y OLMO, E. (1999). The small-subunit rRNA gene sequences of venerids and the phylogeny of Bivalvia. **Molecular Evolution** 48, 463-468.
- CANAPA, A., BARUCCA, M., MARINELLI, A. y OLMO, E. (2000). Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). **Journal of Molecular Evolution** 50, 93-97.
- CANCALON, P.F. (1995a). Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. **Food Technology** 49, 52-58.
- CANCALON, P.F. (1995b). Capillary electrophoresis: a new tool in food analysis. **Journal of AOAC International** 78, 12-15.
- CARRERA, E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1996). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). **Journal of Food Protection** 59, 521-524.

- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1997). Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon, trout and bream. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 74, 547-550.
- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998). Identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using Polymerase Chain Reaction amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. **Journal of Food Protection** 61, 482-486.
- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999a). Salmon and Trout analysis by PCR-RFLP for Identity Authentication. **Journal of Food Science** 64, 410-13.
- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999b). PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gen: A simple method for discrimination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of the Science of Food and Agriculture** 79, 1654-58.
- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999c). Identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. **Journal of Food Protection** 61, 482-486.
- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000). PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene as a genetic marker for identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of AOAC International** 83, 341-346.
- CASTELLI, M., PHILIPPART, J.C., VASSART, G. y GEORGES, M. (1990). DNA fingerprinting in fish, a new generation of genetic markers. **American Fisheries Society Symposium** 7, 514-520.

- CERDA, H. y KOPPEN, G. (1998). DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 207, 22-25.
- CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998). Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis of the cytochrome b gene. **Journal of Food Science** 63, 206-209.
- CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999a). Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1046-1050.
- CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999b). Application of polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. **Journal of AOAC International** 82, 903-907.
- CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999c). Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of sole (*Solea solea*), European plaice (*Pleuronectes platessa*), flounder (*Platichthys flesus*), and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). **Journal of Food Protection** 62, 1178-1182.
- CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000). Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR-RFLP analysis of a 12 S rRNA gene fragment. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80, 29-32.
- CHAIDEDGUMJORN, A., TOIDA, T., IMANARI, T., EUN, R.W., HOKOON, P., LINHARDT, R., SONG, J.W. y YEONG, S.K. (1999). A new sulfated beta-galactan from clams with anti-HIV activity. **Carbohydrate Research** 321, 121-127.

- CHAMPION, A.B., PRAGER, E.M., WANG, A. y WILSON, A.C. (1974). Micro-complement fixation. En: *Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals*. Wright, C.A. (ed.), Academic Press, London, U.K., 397-416.
- CHAPMAN, R.W. y BROWN, B.L. (1990). *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. Whitmore, D.H. (ed.), CRC Press, Cleveland, EE.UU.
- CHEN, L.H., BORDERS, C.L., VASQUEZ, J.R. y KENYON, G.L. (1996). Rabbit muscle creatine kinase: consequences of the mutagenesis of conserved histidine residues. **Biochemistry** 35, 7895-7902.
- CHEN, F-C., HSIEH, Y-H.P. y BRIDGMAN, R.C. (1998). Monoclonal antibodies to porcine thermal-stable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meats. **Journal of Food Science** 63, 201-205.
- CHIKUNI, K., OZUTSUMI, K., KOISHIKAWA, T. y KATO, S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization. **Meat Science** 30, 221-234.
- CHOU, S., SU, S., SHIAU, H., HWANG, D., YU, P. y LEE, S. (1998). Protein and amino acid profiles in natural and artificial shark fins using capillary electrophoresis. **Journal of Food Science** 63, 782-784.
- CHOW, S., CLARKE, M.E. y WALSH, P.J. (1993). PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily *Lutjaninae*): a simple method for species and stock identification. **Fishery Bulletin** 91, 619-627.
- CIVERA, T. y PARISI, E. (1991). The use of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the identification of raw and cooked shrimps and crabs. **Italian Journal of Food Science** 2, 149-157.
- CLARK, R.B. y ENGVALL, E. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. En: *Enzyme Immunoassays*. Magio, E.T. (ed.), CRC Press, Cleveland, EE.UU., 161-179.
- CLAXTON, W.T., MARTEL, A., DERMOTT, R.M. y BOULTING, E.G. (1997). Discrimination of field-collected juveniles of two introduced dreissenids (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) using mitochondrial DNA and shell morphology. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 1280-1288.

- CLAYTON, D.A. (1982). Replication of mammalian mitochondrial DNA. **Cell** 28, 693-705.
- CLAYTON, D.A. (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Annual Review of Biochemistry** 53, 573-594.
- COCOLIN, L., D'AGARO, E., MANZANO, M., LANARI, D. y COMI, G. (2000). Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (seabass, seabream, umbrine, and dentex). **Journal of Food Science** 65, 1315-1317.
- CODURI, R.J. y RAND, A.G. (1972). Vertical plate gel electrophoresis for the differentiation of fish and shellfish species. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 55, 464-466.
- COLBOURNE, J.K., NEFF, B.D., WRIGHT, J.M. y GROSS, M.R. (1996). DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 53, 342-349.
- CONRAD, M. y TOPAL, M.D. (1989). DNA and spermidine provide a switch mechanism to regulate the activity of restriction enzyme *Nae* I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 86, 9707-9711.
- CRONIN, M.A., AMSTRUP, S.C., GARNER, G. y VYSE, E.R. (1991). Intra- and interspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). **Canadian Journal of Zoology** 69, 2985-2992.
- CUNNINGHAM, C.W., BLACKSTONE, N.W. y BUSS, L.W. (1992). Evolution of king crabs from hermit crab ancestors. **Nature** 355, 783-791.
- DAGUIN, C. y BORSA, P. (1999). Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. In North West Africa using nuclear DNA markers. **Journal of Experimental marine Biology and Ecology** 235, 55-65.
- DAHLE, G. (1996). DNA fingerprint pedigree studies of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fisheries Research** 26, 93-99.
- DAHLE, G., RAHMAN, M. y ERIKSEN, A.G. (1997). RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*). **Fisheries Research** 32, 263-269.

- DAUL, C.B., SLATTERY, M., REESE, G. y LEHRER, S.B. (1994). Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. **International Archives of Allergy and Immunology** 105, 49-55.
- DEAN, M., WHITE, M.D., AMOS, J., GERRARD, B., STEWART, C., KHAW, K.T. y LEPPERT, M. (1990). Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. **Cell** 61, 863-870.
- De JUANA, E. y De JUANA A, J.R. (1987). *Guía de pescados y mariscos de consumo usual en España*. Omega (ed.), Barcelona.
- DEMERS, A., LAGADEUC, J.J., DODSON, J.J. y LEMIEUX, R. (1993). Immunofluorescence identification of early life history stages of scallops (Pectinidae). **Marine Ecology Progress Series** 97, 83-89.
- DENNIS, M.J. (1996). Milk and milk products. En *Food Authentication*. Ashurst, P.R. y Dennis, M.J. (Ed.), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, U.K., 378-385.
- DESALLE, R., WILLIAMS, A.K. y GEORGE, M. (1993). Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. **Methods in Enzymology** 224, 176-203.
- DESALLE, R. y BIRSTEIN, V.J. (1996). PCR identification of black caviar. **Nature** 381, 197-198.
- DESHPANDE, S.S. (1996). *Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development*. Chapman & Hall (ed.), New York, EE.UU.
- DINESH, K.R., LIM, T.M., CHUA, K.L., CHAN, W.K. y PHANG, V.P.E. (1993). RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. **Zoological Science** 10, 849-854.
- DINESH, K.R., CHAN, W.K., LIM, T.M. y PHANG, V.P.E. (1995). RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 3, 112-118.
- DINESH, K.R., LIM, T.M., CHAN, W.K. y PHANG, V.P.E. (1996). Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. **Aquaculture International** 4, 19-30.

- DIRECTIVA 97/4/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L43, de 14 de febrero de 1997.
- DIRECTIVA 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de marzo, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L109, de 6 de mayo de 2000.
- DOBERSTEIN, K.H. y GREUEL, E. (1982). The preparation of specific antisera for the identification of meat of African antelope species in agar gel precipitation test. **Fleischwirtschaft** 62, 1011-1013.
- DOMANICO, M.J., PHILLIPS, R.B. y SCHWEIGERT, J.F. (1996). Sequence variation in ribosomal DNA of Pacific (*Clupea pallasii*) and Atlantic herring (*Clupea harengus*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 53, 2418-2423.
- DOMANICO, M.J., PHILLIPS, R.B. y OAKLEY, T.H. (1997). Phylogenetic analysis of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) using nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 1865-1872.
- DOMÍNGUEZ, E., PÉREZ, M.D., PUYOL, P. y CALVO, M. (1997). Use of immunological techniques for detecting species substitution in raw and smoked fish. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 204, 279-281.
- DOVEY, S. y TOWNER, K.J. (1989). A biotinylated DNA probe to detect bacterial cells in artificially contaminated foodstuffs. **Journal of Applied Bacteriology** 66, 43-47.
- DOWDIE, O.G. y BIEDE, S.L. (1983). Influence of processing temperature on the distribution of tissue and water-soluble proteins in blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Journal of Food Science** 50, 1143.

- DREYFUSS, M.S., CUTRUFELLI, M.E., MAGEAU, R.P. y McNAMARA, A.M. (1997). Agar-gel immunodiffusion test for rapid identification of pollock surimi in raw meat products. **Journal of Food Science** 62, 972-975.
- DUMAS, C. y CAMONIS, J. (1993). Cloning and sequence analysis of the cDNA for arginine kinase of lobster muscle. **Journal of Biological Chemistry** 268, 21599-21605.
- DUNBAR, B.S. y SCHWOEBEL, E.D. (1990). Preparation of polyclonal antibodies. **Methods in Enzymology** 182, 663-670.
- DURAND, M., MEUSNIER, M., DELAHAYE, J. y PRUNET, P. (1974). Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gélose. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire** 47, 247-258.
- DURAND, P., LANDREIN, A. y QUERO, J.C. (1985). *Catalogue Électrophorétique des Poissons Commerciaux*. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Nantes, Francia.
- DYSON, H.J. y WRIGHT, P.E. (1995). Antigenic peptides. **FASEB Journal** 9, 37-42.
- EBASHI, S. y ENDO, M. (1968). Calcium ion and muscle contraction. **Progress in Biophysical and Molecular Biology** 18, 123-183.
- EBBEHØJ, K.F. y THOMSEN, P.B. (1991). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. **Meat Science** 30, 221-234.
- ELO, K., IVANOFF, S., VUORINEN, J.A. y PIIRONEN, J. (1997). Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. **Aquaculture** 152, 55-65.
- ELSAIED, S. y AAS, K. (1971). Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. **International Archives of Allergy and Immunology** 40, 428-438.
- ENGELS, B. (1992). *Amplify*, versión 2.0; University of Wisconsin, Genetics; Madison, Wisconsin, EE.UU.

- EPPEMBERGER, H.M., DAWSON, D.M. y KAPLAN, N.O. (1967). The comparative enzymology of creatine kinases II. Physical and chemical properties. **Journal of Biology and Chemistry** 242, 204-209.
- ESTOUP, A., PRESA, P., KRIEG, F., VAIMAN, D. y GUYOMARD, R. (1993). (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity** 71, 488-496.
- ETIENNE, M., JÉRÔME, M., FLEURENCE, J., REHBEIN, H., KUNDIGER, R., MALMHEDEN-YMAN, I., FERM, M., CRAIG, A., MACKIE, I., JESSEN, F., SMELT, A. y LUTEN, J. (1999). A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: A collaborative study. **Electrophoresis** 20, 1923-1933.
- ETIENNE, M., JÉRÔME, M. y FLEURENCE, J. (2000). Species identification of raw and cooked bivalves using electrophoresis. **Sciences des Aliments** 20, 367-377.
- ETIENNE, M., JÉRÔME, M., FLEURENCE, J., REHBEIN, H., KUNDIGER, R., MENDES, R., COSTA, H. y MARTÍNEZ, I. (2001). Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: A collaborative study. **Food Chemistry** 72, 105-112.
- FAIRBROTHER, K.S., HOPWOOD, A.J., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1998). The actin multigene family and livestock speciation using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology** 9, 89-100.
- FAN, E., LEVIN, D.B., GLICKMAN, B.W. y LOGAN, D.M. (1993). Limitations in the use of SSCP analysis. **Mutation Research** 288, 85-92.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2000a). *Estadísticas de Pesca. Capturas*, vol. 86 (1). **FAO Statistics Series**. Roma (Italia).
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2000b). *Estadísticas de Pesca. Producción de acuicultura*, vol. 86 (2). **FAO Statistics Series**. Roma (Italia).
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2000c). *Estadísticas de Pesca. Productos*, vol. 87. **FAO Statistics Series**. Roma (Italia).

- FELSENSTEIN, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. distributes by the author, University of Washington, Seattle, WA.
- FERGUSON, A., TAGGART, J.B., PRODÖHL, P.A., McMEEL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P. y HYNES, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology** 47, S103-S126.
- FERNÁNDEZ, F.A. (1995). *Guía para a identificación dos mariscos en Galicia*. Consejería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura, Junta de Galicia (ed.).
- FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, T., ASENSIO, L., RODRÍGUEZ, M.A., GONZÁLEZ, I., CÉSPEDES, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000a). Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell), and *Ruditapes philippinarum* (japanese carpet shell) by PCR-RFLP. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48, 3336-3341.
- FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, T., ASENSIO, L., RODRIGUEZ, M.A., GONZÁLEZ, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000b). Almejas de interés comercial en España I. Producción y comercialización. **Alimentaria** 318, 113-119.
- FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, T., ASENSIO, L., RODRIGUEZ, M.A., GONZÁLEZ, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000c). Almejas de interés comercial en España II. Identificación de especies. **Alimentaria** 318, 121-128.
- FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, T., ASENSIO, L., RODRIGUEZ, M.A., LOBO, E., GONZÁLEZ, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2001). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) and *Ruditapes philippinarum* (japanese carpet shell). **Journal of Food Science** 66, 657-661.
- FOIGHIL, D.Ó., GAFFNEY, P.M. y HILBISH, T.J. (1995). Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 192, 211-220.

- FOIGHIL, D.Ó., GAFFNEY, P.M., WILBUR, A.E. y HILBISH, T.J. (1998). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the portuguese oyster *Crassostrea angulata*. **Marine Biology** 131, 497-503.
- FONTAINE, P., DODSON, J.J., BERNATCHEZ, L. y SLETTAN, A. (1997). A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 2434-2442.
- FORNWALD, J.A., KUNCIO, G., PENG, I. y ORDAHL, P. (1982). The complete nucleotide sequence of the chick α -actin gene and its evolutionary relationship to the actin gene family. **Nucleic Acids Research** 10, 3861-76.
- FORREST, A.R.R. y CARNEGIE, P.R. (1994). Identification of gourmet meat using FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). **Biotechniques** 17, 24-26.
- FRANCE, R.M., SELLERS, D.S. y GROSSMAN, S.H. (1997). Purification, characterization, and hydrodynamic properties of arginine kinase from gulf shrimp (*Penaeus aztecus*). **Archives of Biochemistry and Biophysics** 345, 73-78.
- FRITZ, G.N., CONN, J., COCKBURN, A. y SEAWRIGHT, J. (1994). Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Molecular Biology and Evolution** 11, 406-416.
- FUJITA, K. y SILVER, J. (1994). Single-strand conformational polymorphism. **PCR Methods and Applications** 4, S137-S140.
- FURTER, R., FURTE-GRAVES, E.M. y WALLIMANN, T. (1993). Creatine kinase: the reactive cysteine is required for synergism but is non-essential for catalysis. **Biochemistry** 32, 7022-7029.
- FURUKOHRI, T., OKAMOTO, S. y SUZUKI, T. (1994). Evolution of phosphagen kinase (III). Amino acid sequence of arginine kinase from the shrimp *Penaeus japonicus*. **Zoology Science** 11, 229-234.

- GACHET, E., MARTÍN, G.G., VIGNEAU, F. y MEYER, G. (1999). Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Trends in Food Science and Technology** 9, 380-388.
- GALVIN, P., SADUSKY, T., MCGREGOR, D. y CROSS, T. (1995). Population genetics of Atlantic cod using amplified single locus minisatellite VNTR analysis. **Journal of Fish Biology** 47, S200-S-208.
- GALLARDO, J.M., SOTELO, C.G., PIÑEIRO, C. y PERÉZ-MARTÍN, R.I. (1995). Use of capillary zone electrophoresis for fish species identification. Differentiation of flatfish species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43, 1238-1244.
- GANGAR, V., HUANG, T.S. y WEI, C.I. (1996). Comparison of crabmeat protein patterns by isoelectric focusing. **Food Control** 7, 295-307.
- GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., AZCONA, J.I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1991). Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Food Protection** 54, 366-369.
- GARCÍA, T., MARTÍN, R., MORALES, P., HAZA, A., ANGUITA, G., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1994). Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 66, 411-415.
- GARRIDO-RAMOS, M.A., JAMILENA, M., LOZANO, R., CÁRDENAS, S., RUIZ, C. y RUIZ, M. (1995). Phylogenetic relationships of the *Sparidae* family (Pisces, Perciformes) inferred from satellite-DNA. **Hereditas** 122, 1-6.
- GEARING, A.J.H., THORPE, R., SPITZ, L. y SPITZ, M. (1985). Use of "single shot" intrasplenic immunization for production of monoclonal antibodies specific for human Ig M. **Journal of Immunological Methods** 76, 337-343.
- GELLER, J.B., CARLTON, J.T. y POWERS, D.A. (1993). Interspecific and intrapopulation variation in mitochondrial ribosomal DNA sequences of *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mollusca). **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 2, 44-50.

- GEORGES, M., LEQUARRE, A.S., CASTELLI, M., HANSET, R. y VASSART, G. (1988). DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. **Cytogenetics and Cell Genetics** 47, 127-131.
- GERBI, S.A. (1985). Evolution of ribosomal DNA. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. Macintyre, R.J. (ed.), Plenum Press, New York, EE.UU., 443-448.
- GJETVAJ, B., BALL, R.M., BURBRIDGE, S., BIRD, C.J., KENCHINGTON, E. y ZOURUS, E. (1997). Amounts of polymorphism at microsatellite loci in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. **Journal of Shellfish Research** 16, 547-553.
- GLAVAC, D. y DEAN, M. (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. **Human Mutation** 2, 404-414.
- GODING, J.W. (1996). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3rd ed. Academic Press Inc. Limited, London, U.K.
- GOLENBERG, E.M., BICKEL, A. y WEIHS, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. **Nucleic Acid Research** 24, 5026-5033.
- GONZALEZ, I.L., SYLVESTER, J.E., SMITH, T.F., STAMBOLIAN, D. y SCHMICKEL, R.D. (1990). Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny. **Molecular Biology and Evolution** 7, 203-219.
- GOODIER, J.L. y DAVIDSON, W.S. (1998). Characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. **Journal of Molecular Evolution** 46, 245-255.
- GOSLING, J.P. (1990). A decade of development in immunoassay methodology. **Clinical Chemistry** 36, 1408-1427.
- GRENON, J.F. y WALKER, G. (1981). The tenacity of the limpet *Patella vulgata* L.: an experimental approach. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 4, 277-308.
- GRIFFITHS, R.C. y TAVARÉ, S. (1994). Ancestral inference in population genetics. **Statistical Science** 9, 307-319.

- GROSS, R., NILSSON, J. y SCHMITZ, M. (1996). A new species-specific nuclear DNA marker for identification of hybrids between Atlantic salmon and brown trout. **Journal of Fish Biology** 49, 537-540.
- GUTIÉRREZ, R., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998). Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Letters in Applied Microbiology** 26, 372-376.
- HAIG, S.M. (1998). Molecular contributions to conservation. **Ecology** 79, 413-425.
- HALL, H.J. y NAWROCKI, L.W. (1995). A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout, *Salmo trutta*. **Journal of Fish Biology** 46, 360-364.
- HAMILTON, W.D. (1982). Fish species identification by thin layer agarose isoelectric focusing and densitometric scanning. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 65, 119-122.
- HANSEN, T.J. (1990). Immunochemical methods for mycotoxin detection in food products. **Trends in Food Science and Technology** 1, 83-88.
- HANSEN, M.M. y LOECHCKE, V. (1996). Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. **Journal of Fish Biology** 48, 422-436.
- HARA, M., NOGUCHI, M., NAITO, E., DEWA, K. y YAMANOUCHI, H. (1994). Ribosomal RNA gene typing of fish genome using PCR-SSCP method. **Bulletin of the Japan Sea National Fisheries Research Institute** 44, 131-138.
- HARDING, G.C., KENCHINGTON, E.L., BIRD, C.J., PEZZACK, D.S. y LANDRY, D.C. (1997). Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 1762-1771.
- HARLOW, E. y LANE, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed.), New York, EE.UU.
- HARLOW, E. y LANE, D. (1999). *Using Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed.), New York, EE.UU.

- HARRIS, A.S. y WRIGHT, J.M. (1995). Nucleotide sequence and genomic organization of cichlid fish minisatellites. **Genome** 38, 177-184.
- HARRISON, R.G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution** 4, 6-11.
- HATZOGLU, H., GEORGE, C. y LECANIDOU, R. (1995). Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. **Genetics** 140, 1353-1366.
- HAYASHI, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of point mutations in the genomic DNA. **PCR Methods and Applications** 1, 34-38.
- HAYASHI, K. y YANDELL, W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP? **Human Mutation** 2, 338-346.
- HAYASHI, K. (1996). Single strand conformational polymorphism analysis of PCR products. En: *Laboratory Protocols for Mutation Detection*. Landegren, U. (ed.), Oxford University Press, Oxford, U.K., 14-22.
- HEATH, D.D., RAWSON, P.D. y HILBISH, T.J. (1995). PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 52, 2621-2627.
- HEATH, D.D. y HILBISH, T.J. (1998). *Mytilus* protamine-like sperm-specific protein genes are multicopy, dispersed, and closely associated with hypervariable RFLP regions. **Genome** 41, 587-596.
- HENRY, J., ZATYLMY, C. y FAVREL, P. (2000). HPLC and electrospray ionization mass spectrometry as tools for the identification of APGWamide-related peptides in gastropod and bivalve mollusks: comparative activities on *Mytilus* muscles. **Brain Research** 862, 162-170.
- HERNÁNDEZ, P.E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., ANGUITA, G., HAZA, A.I., GONZÁLEZ, I. y SANZ, B. (1994). Antibody based analytical methods for meat species determination and detecting adulteration of milk. **Food Agriculture and Immunology** 6, 95-104.
- HILL, W.E. (1996). The polymerase chain reaction application for detection of food-borne pathogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 36, 123-173.

- HOCH, H. y CHANUTIN, A. (1954). Albumin from heated human plasma, I. Preparation and electrophoretic properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 51, 271-276.
- HOFMANN, K. (1987). Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods. **Fleischwirtschaft** 67, 820-826.
- HOFFMANN, R.J., BOORE, J.L. y BROWN, W.M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Genetics** 131, 397-412.
- HOPWOOD, A.J., FAIRBROTHER, K.S., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. **Meat Science** 53, 227-231.
- HORAK, I., COON, H.G. y DAVID, I.B. (1974). Interspecific recombination of mitochondrial DNA molecules in hybrid somatic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 71, 23-24.
- HSIEH, Y.-H.P., CHEN, F.-C. y NUR, M. (1997). Rapid species identification of cooked red snapper using isoelectric focusing. **Journal of Food Science** 62, 15-19.
- HU, M.C.-T., SHARP, S.B. y DAVISON, N. (1986). The complete sequence of the mouse skeletal α -actin gene reveals several conserved and inverted repeat sequences outside of the protein-coding region. **Molecular and Cellular Biology** 6, 15-25.
- HU, Y-P., LUTZ, R.A. y VRIJENHOEK, R.C. (1992). Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. **Marine Biology** 113, 227-230.
- HUANG, T., MARSHALL, M.R., KAO, K., OTWELL, W.E. y WEI, C. (1995). Development of monoclonal antibodies for red snapper (*Lutjanus campechanus*) identification using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43, 2301-2307.
- HUI, G.S. (1994). Liposomes, muramyl dipeptide derivatives, and nontoxic lipid A derivatives as adjuvants for human malaria vaccines. **The American Journal of Tropical medicine and Hygiene** 50, 41-51.

- HUNT, D.J., PARKES, H.C. y LUMLEY, I.D. (1997). Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. **Food Chemistry** 60, 437-442.
- HURK, J.A.J.M., POL, T.J.R., MOLLOY, C.M., BRUNSMANN, F., RUETHER, K., ZRENNER, E., PINCKERS, A.J.L.G., PAWLOWITZKI, I.H., BLEEKER-WAGEMAKERS, E.M., WIERINGA, B., ROPERS, H.H. y CREMERS, F.P.M. (1992). Detection and characterization of point mutations in the chloroderma candidate gene by PCR-SSCP analysis and direct DNA sequencing. **American Journal of Human Genetics** 50, 1195-1202.
- HYNES, R.A., DUKE, E.J. y JOYCE, P. (1989). Mitochondrial DNA as a genetic marker for brown trout, *Salmo trutta* L., populations. **Journal of Fish Biology** 35, 687-701.
- INAZUKA, M., WENZ, H-M., SAKABE, M., TAHIRA, T. y HAYASHI, K. (1997). A streamlined mutation detection system: multicolor post-PCR fluorescence labeling and single-strand conformational polymorphism analysis by capillary electrophoresis. **Genome Research** 7, 1094-1103.
- INNIS, M.A., MYAMBO, K.B., GELFAND, D.H. y BROW, D. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 85, 9436-9440.
- INOUE, K., HERBERT, W., MATSUOKA, M., ODO, S. y HARAYAMA, S. (1995). Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. **Biology Bulletin** 189, 370-375.
- IRWIN, D.M., KOCHER, T.D. y WILSON, A.C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution** 32, 128-144.
- ISHIKAWA, M., ISHIDA, M., SHIMAKURA, K., NAGASHIMA, Y. y SHIOMI, K. (1998). The major oyster *Crassostrea gigas* allergen and its IgE-binding epitopes. **Journal of Food Science** 63, 44-47.
- IWAHANA, H., YOSHIMOTO, K. y ITAKURA, M. (1992). Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. **BioTechniques** 12, 64-65.

- JEFFREYS, A.J., TAMAKI, K., MACLEOD, A., MONCKTON, D.G., NEIL, D.L. y ARMOUR, J.A.L. (1994). Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. **Nature Genetics** 6, 136-145.
- JONES, S.J. y PATTERSON, R.L.S. (1986). A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagents. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 37, 767-775.
- JONES, D.D., LAW, R. y BEJ, A.K. (1993). Detection of *Salmonella* spp. in oysters using polymerase chain reactions and gene probes. **Journal of Food Science** 58, 1191-1202.
- KENCHINGTON, E., NAIDU, K.S., RODDICK, D.L., COOK, D.I. y ZOUROS, E. (1993). Use of biochemical genetic markers to discriminate between adductor muscles of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) and the Iceland scallop (*Chlamys islandica*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 50, 1222-1228.
- KENCHINGTON, E., LANDRY, D. y BIRD, C.J. (1995). Comparison of taxa of the mussel *Mytilus* (Bivalvia) by analysis of the nuclear small-subunit rRNA gene sequence. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 52, 2613-2620.
- KENYON, G.L. y REED, G.H. (1986). Creatine kinase: structure-activity relationships. **Advances in Enzymology** 54, 367-426.
- KIMURA, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16, 111-120.
- KING, T.L., EACKLES, M.S., GJETVAJ, B. y HOEH, W.R. (1999). Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. **Molecular Ecology** 8, 565-578.
- KING, T.L., KALINOWSKI, S.T., SCHILL, W.B., SPIDLE, A.P. y LUBINSKI, B.A. (2001). Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. **Molecular Ecology** 10, 807-821.

- KIRBY, R.R. (2000). Cloning and primary structure of putative cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenase from the mollusc *Nucella lapillus* (L.). **Gene** 245, 81-88.
- KITTS, D., LEUNG PAN SHUM, M. y SMITH, D.S. (1997). Species identification of shellfish using SDS-PAGE electrophoresis. En: *Seafood Safety, Processing and Biotechnology*. Shahidi, F., Jones, Y. y Kitts, D.D. (Ed.), Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania, EE.UU., 235-241.
- KNUUTINEN, J. y HARJULA, P. (1998). Identification of fish species by reverse-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Journal of Chromatography** 705, 11-21.
- KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. y WILSON, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 86, 6196-6200.
- KOCHER, T.D., LEE, W.-J., SOBOLEWSKA, H., PENMAN, D. y McANDREW, B. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics** 148, 1225-1232.
- KOH, M.C., LIM, C.H., CHUA, S.B., CHEW, S.T. y PHANG, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. **Meat Science** 48, 275-285.
- KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256, 495.
- KREADER, C.A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin of T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology** 62, 1102-1106.
- KRÜGER, D.H., BARCAK, G.J., REUTER, M. y SMITH, H.O. (1988). *Eco* RII can be activated to cleave refractory DNA recognition sites. **Nucleic Acid Research** 16, 3997-4008.
- KURABAYASHI, A. y UESHIMA, R. (2000). Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*:

- systematic implication of the genome organization. **Molecular Biology and Evolution** 17, 266-277.
- KUSSER, W.C., PARKER, R.L. y MIAO, X. (1994). Polymerase chain reaction and DNA sequence of rainbow trout tumor suppressor gene *p53* exons 5, 6 and 7 to 9. **Aquatic Living Resources** 7, 11-16.
- KWOK, S. y HIGUCHI, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. **Nature** 339, 237-238.
- KWOK, S., CHANG, S-Y., SNINDKY, J.J. y WANG, A. (1994). A guide design and use of mismatched and degenerate primers. **PCR Methods and Applications** 3, S39-S47.
- LAIRD, W.M., MACKIE, I.M. y RITCHIE, A.H. (1982). Differentiation of species of fish by isoelectric focusing on agarose and polyacrylamide gels. A comparison. **Journal of Association of Public Analysis** 20, 125-135.
- LEBLANC, E.L., SINGH, S. y LEBLANC, R.J. (1994). Capillary zone electrophoresis of fish muscle sarcoplasmic proteins. **Journal of Food Science** 59, 1267-1270.
- LEE, W.J. y MORGAN, M.R.A. (1993). Food immunoassays: applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. **Trends in Food Science and Technology** 4, 129-133.
- LEIGHTON-JONES, J. (1991). DNA probes: applications in the food industry. **Trends in Food Science and Technology** 2, 28-32.
- LESSA, E. y APPLEBAUM, G. (1993). Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. **Molecular Ecology** 2, 121-129.
- LEUNG, P.S.C., CHU, K.H., CHOW, W.K., ANSARI, A., BANDEA, C.I., KWAN, H.S., NAGY, S.M. y GERSHWIN, M.E. (1994). Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 94, 882-890.
- LEVIEUX, D. y VENIEN, A. (1994). Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. **Journal of Dairy Research** 61, 91-99.

- LI, G. y HEDGECOCK, D. (1998). Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 55, 1025-1033.
- LINDSTRØM, C.D.-V., VAN DÔ, T., HORDVIK, I., ENDRESEN, C. y ELSAYED, S. (1996). Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Scandinavian Journal of Immunology** 44, 335-344.
- LITTLEFIELD, J.W. (1964). Selection of hybrides from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. **Science** 145, 709.
- LIVERA, W.C.D. y SHIMIZU, C. (1989). Comparison and characterization of arginine kinases from the prawn *Penaeus japonicus* (Kurumaebi) and the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Gazami). **Agricultural and Biological Chemistry** 53, 2377-2386.
- LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science and Technology** 11, 67-77.
- LÖFFERT, D., STUMP, S., SCHAFFRATH, N., BERKENKOPF, M. y KANG, J. (1997). PCR: effects of template quality. **Qiagen-News** 1, 8-9.
- LOTINA, R. (1992). *Mariscos y especies afines*. Diputación Foral de Bizkaia (ed.), Vizcaya.
- LUDWIG, A. y KIRSCHBAUM, F. (1998). Comparison of mitochondrial DNA sequences between the European and the Adriatic sturgeon. **Journal of Fish Biology** 52, 1289-1291.
- LUNDSTROM, R. (1980). Fish species identification by thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing: Collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 63, 69-73.
- MACKIE, I.M. (1996). Authenticity of fish. En: *Food Authentication*. Ashurst, P.R. y Dennis, M.J. (Ed.), Blackie Academic and Professional, London, U.K., 140-170.
- MACKIE, I.M., PRYDE, S.E., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R., QUNTEIRO, J., REY-MENDEZ, M. y REHBEIN, H. (1999).

Challenges in the identification of species of canned fish. **Trends in Food Science and Technology** 10, 9-14.

MACKIE, I.M., CRAIG, A., ETIENNE, M., JÉRÔME, M., FLEIRENCE, J., JESSEN, F., SMELT, A., KRUIJT, A., MALMHEDEN YMAN, I., FERM, M., MARTÍNEZ, I., PÉREZ-MARTÍN, R., PIÑEIRO, C., REHBEIN, H. y KÜNDIGER, R. (2000). Species identification of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: a collaborative study. **Food Chemistry** 71, 1-7.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed.), New York, EE.UU.

MARGUET, E. y FORTERRE, P. (1998). Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. **Extremophiles** 2, 115-122.

MARKLUND, S., CHAUDHARY, R., MARKLUND, L., SANDBERG, K. y ANDERSON, L. (1995). Extensive mtDNA diversity in horse revealed by PCR-SSCP analysis. **Animal Genetics** 26: 193.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., CASAS, C., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988). Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. **Journal of Food Protection** 51, 790-794.

MARTÍN, R., WARDALE, R.J., JONES, S.J., HERNÁNDEZ, P.E. y PATTERSON, R.L.S. (1989). Production and characterization of monoclonal antibodies specific to chicken muscle soluble proteins. **Meat Science** 25, 199-207.

MARTÍN, R., WARDALE, R.J., JONES, S.J., HERNÁNDEZ, P.E. y PATTERSON, R.L.S. (1991). Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. **Meat Science** 30, 23-31.

MARTÍNEZ, M.I., RODRÍGUEZ, J.M., SUÁREZ, A., MARTÍNEZ, J.M., AZCONA, J.I. y HERNÁNDEZ, P.E. (1997). Generation of polyclonal antibodies against a chemically synthesized N-terminal fragment of the bacteriocin pediocin PA-1. **Letters in Applied Microbiology** 24, 488-492.

- MARTÍNEZ, J.M., MARTÍNEZ, M.I., SUÁREZ, A., HERRANZ, C., CINTAS, L.M., RODRÍGUEZ, J.M. y HERNÁNDEZ, P.E. (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 4536-4545.
- MARTÍNEZ, I. y DANÍELSDÓTTIR, A.K. (2000). Identification of marine mammal species in food products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80, 527-533.
- MARTÍNEZ, I. y MALMHEDEN YMAN, I. (1999). Species identification in meat products by RAPD analysis. **Food Research International** 31, 459-466.
- MARTÍNEZ-LAGE, A., GONZÁLEZ-TIZÓN, A. y MÉNDEZ, J. (1995). Chromosomal markers in the three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). **Heredity** 74, 369-375.
- MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHINMURA, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science** 51, 143-148.
- McCONNEL, S.K., O'REILLY, P., HAMILTON, L., WRIGHT, J.M. y BENTZEN, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*), genetic differentiation of North American and European populations. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 52, 1863-1872.
- McGOLDRICK, D.J., HEDGECK, D., ENGLISH, L.J., BAOPRASERTKUL, P. y WARD, R.D. (2000). The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Selection and null alleles. **Journal of Shellfish Research** 19, 779-788.
- McKAY, S.J., DEVLIN, R.H. y SMITH, M.J. (1996). Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 53, 1165-1176.
- McLEAN, M., GERATS, G.M., BAIRD, W.V. y MEAGHER, R.B. (1990). Six actin gene subfamilies map to five chromosomes of *Petunia hybrida*. **Journal of Heredity** 81, 341-346.

- McPHERSON, J.D., MARRA, M., HILLIER, L., WATERSON, R.H. y CHINWALLA, A. (2001). A physical map of the human genome. **Nature** 409, 934-941.
- MERCHANTE, E. y ORTÍN, F.J. (1993). Diferenciación de especies en salmón y trucha ahumada por isoelectroenfoque (IEF) en PhastSystem. **Alimentaria** 244, 65-67.
- MERUANE, J., TAKAGI, M. y TANIGUCHI, N. (1997). Species identification and polymorphisms using RAPD-PCR in Penaeid prawns *Panaeus japonicus* and *Metapenaeus ensis*. **Fisheries Science** 63, 149-150.
- MEYER, R. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 2: Molecular Biology Frontiers*. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Ed.), Elsevier Science Ltd., Philadelphia, EE.UU., 1-38.
- MEYER, R., CANDRIAN, U. y LÜTHY, J. (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International** 77, 617-622.
- MEYER, R., HÖFELEN, C., LÜTHY, J. y CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International** 76, 1542-1551.
- MEYER, R. y CANDRIAN, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 29, 1-9.
- MILINKOVITCH, M.C., ORIT, G. y MEYER, A. (1993). Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Nature** 361, 346-348.
- MILLER, K.M., WITHLER, R.E. y BEACHAM, T.D. (1996). Stock identification of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) using minisatellite DNA variation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 53, 181-195.
- MINDELL, D.P. y HONEYCUTT, R.L. (1990). Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic applications. **Annual Review of Ecology and Systematics** 21, 541-566.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2001). *Consumo en España. Año 2000*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

- MIYAZAWA, H., FUKAMACHI, H., INAGAKI, Y., REESE, G., DAUL, C.B., LEHRER, S.B., INOUE, S. y SAKAGUCHI, M. (1996). Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 98, 948-953.
- MJØLNERØD, I.B., REFSETH, U.H., KARLSEN, E., BALSTAD, T., JAKOBSEN, K.S. y HINDAR, K. (1997). Genetic differences between two wild and one farmed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*) revealed by three classes of genetic markers. **Hereditas** 127, 239-248.
- MOHABEER, A.J., HITI, A.L. y MARTÍN, W.J. (1991). Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "Phastsystem". **Nucleic Acids Research** 19, 3154.
- MORITZ, C., DOWLING, T.E. y BROWN, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 269-292.
- MORRIS, D.B., RICHARD, K.R. y WRIGHT, J.M. (1996). Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 53, 120-126.
- MORRISON, J.F. (1973). *The Enzymes*. Boyer, P.C. (ed.), Academic Press, New York, EE.UU., vol. 8.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. y ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** 51, 263-273.
- MURRAY, B.W., McCLYMONT, R.A. y STROBECK, C.S. (1995). Forensic application of ungulate species using restriction digest of PCR-amplified mitochondrial DNA. **Journal of Forensic Sciences** 40, 943-951.
- NASSIF, N.T. y MACKINLAY, A.G. (1996). Detection and characterization of two novel hypervariable microsatellite repeat regions within intron 2 of the α -globin gene of the bivalve mollusc *Anadara trapezia*. **Gene** 183, 225-230.
- NETI, G. y REHBEIN, H. (1998). Fish species identification by fish muscle dry powder as reference material. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 46, 81-96.

- NIELSEN, J.L., GAN, C. y THOMAS, W.K. (1994). Differences in genetic diversity for mitochondrial DNA between hatchery and wild populations of *Oncorhynchus*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 51, 290-297.
- NOAH, C.W., POTTET, S.S., LISTER, M.M., RODERICK, C.N., SMITH, D.B., COLVERT, R.M., HOLLAND, M.A. y CERNIGLIA, C.E. (1996). Production and characterization of monoclonal antibodies to detect *Vibrio cholerae* serogroup 01 in a rapid enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Food Protection** 59, 1153-1157.
- OBERST, S., ABBAN, E.K. y VILLWOCK, W. (1996). Biochemical and immunological markers for the discrimination of three *Tilapia* species: *T. zillii* Gervais, *T. guineensis* Bleker and *T. dageti* Thys v. d. Audenaerde (Pisces, Cichlidae) from West Africa. **Aquaculture Research** 27, 235-244.
- O'CONNELL, M., DANZMANN, R.G., CORNUET, J., WRIGHT, J.M. y FERGUSON, M. (1997). Differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in Lake Ontario and the evaluation of the stepwise mutation and infinite allele mutation models using microsatellite variability. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 1391-1399.
- OHRESSER, M., BORSA, P. y DELSERT, C. (1997). Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 6, 123-130.
- OLLER, A.R., VANDENBROEK, W., CONRAD, M. y TOPAL, M.D. (1991). Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species. **Biochemistry** 30, 2543-2549.
- OOHARA, I. (1997). Detection of single strand conformation polymorphisms (SSCPs) on mitochondrial DNA fragments between two domesticated strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science** 63, 151-152.
- O'REILLY, P. y WRIGHT, J.M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology** 47, 29-55.

- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. y SEKIYA, T. (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 86, 2766-2770.
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. y HAYASHI, K. (1989b). A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics** 5, 874-879.
- OSMAN, M.A., ASHOOR, S.H. y MARSH, P.C. (1987). Liquid chromatographic identification of common fish species. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 70, 618-625.
- OSTE, C. (1989). Optimization of magnesium concentration in the PCR reaction. **Amplifications** 1, 10.
- PALUMBI, S.R., MARTÍN, A.P., ROMANO, S., MCMILLAN, W.O., STICE, L. y GRABOWSKI, G. (1991). *The simple fool's guide to PCR*. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- PANACCIO, M. y LEW, A. (1991). PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. **Nucleic Acids Research** 19, 1151.
- PARTIS, L. y WELLS, R.J. (1996). Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Molecular and Cellular Probes** 10, 435-441.
- PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T. y MURBY, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. **Meat Science** 54, 369-376.
- PATTERSON, R.L.S. y JONES, S.J. (1990). Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. **Analyst** 115, 501-506.
- PATWARY, M.U., KENCHINGTON, E.L., BIRD, C.J. y ZOURUS, E. (1994). The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). **Journal of Shellfish Research** 13, 547-553.

- PATWARY, M.U., REITH, M. y KENCHINGTON, E.L. (1996). Isolation and characterization of a cDNA encoding an actin gene from sea scallop (*Placopecten magellanicus*). **Journal of Shellfish Research** 15, 265-270.
- PAUGAM, A., LE PENNEC, M. y GENEVIÉVE, A-F. (2000). Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. **Journal of Shellfish Research** 19, 325-331.
- PEIN, C.D., REUTER, M., MEISEL, A., CECHE, D. y KRÜGER, D.H. (1991). Activation of restriction endonuclease *Eco* RII does not depend on the cleavage of stimulator DNA. **Nucleic Acids Research** 19, 5139-5142.
- PELLÓN, J.R. y HERNÁNDEZ, P.E. (1987). Biotecnología en el diagnóstico alimentario. **Biotechnología** 3, 8-11.
- PENDÁS, A.M., MORÁN, P., MARTÍNEZ, J.L. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (1995). Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. **Molecular Ecology** 4, 275-276.
- PENEDO, J.C., MILLÁN, R., SALAZAR, A., CASTELO, M., CARDONA, A. y SANJUAN, E. (1992). Identificación de especies en pescado fileteado fresco y congelado por técnica de isoelectroenfoque (IEF). **Alimentaria** 235, 55-57.
- PERÉZ, J., MARTÍNEZ, J.L., MORÁN, P., BEALL, E. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (1999). Identification of Atlantic salmon x brown trout hybrids with a nuclear marker useful for evolutionary studies. **Journal of Fish Biology** 54, 460-464.
- PERNA, N.T. y KOCHER, T.D. (1996). Mitochondrial DNA: molecular fossils in the nucleus. **Current Biology** 6, 128-129.
- PERRYMAN, M.B., KERNER, S., BOHLMER, T.J. y ROBERTS, R. (1986). Isolation and sequence analysis of a full length cDNA for human M creatine kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 140, 981-989.
- PHILLIPS, R.B., PLEYTE, K.A. y BROWN, M.R. (1992). Salmonid phylogeny inferred from ribosomal DNA restriction maps. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 49, 2345-2353.
- PHILLIPS, R.B., MANLEY, S.A. y DANIELS, T.J. (1994). Systematics of the salmonid genus *Salvelinus* inferred from ribosomal DNA sequences. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 51, 198-204.

- PHILLIPS, R.B., GUDEX, L.I., WESTRICH, K.M. y DECICCO, A.L. (1999). Combined phylogenetic analysis of ribosomal ITS-1 sequences and new chromosome data supports three subgroups of Dolly varden char (*Salvelinus malma*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 56, 1504-1511.
- PIÑEIRO, C., SOTELO, C.G., MEDINA, I., GALLARDO, J.M. y PÉREZ-MARTÍN, R.I. (1997). Reversed-phase HPLC as a method for identification of gadoid fish species. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 204, 411-416.
- PIÑEIRO, C., BARROS-VELÁZQUEZ, J., SOTELO, C.G. y GALLARDO, J.M. (1999). The use of two-dimensional electrophoresis in the characterization of the water-soluble protein fraction of commercial flat fish species. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 208, 342-348.
- PIÑEIRO, C., BARROS-VELÁZQUEZ, J., PÉREZ-MARTÍN, R.I. y GALLARDO, J.M. (2000). Specific enzyme detection following isoelectric focusing as a complementary tool for the differentiation of related Gadoid fish species. **Food Chemistry** 70, 241-245.
- PLEYTE, K.A., DUNCAN, S.D. y PHILLIPS, R.B. (1992). Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed (ITS 1) of ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 1, 223-230.
- PLOHL, M. y CORNUDELLA, L. (1996). Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax truchulus*: analysis of sequence variations and divergence. **Gene** 169, 157-164.
- PLOWMAN, J.E. y HERBERT, B.R. (1992). Identification of the species of origin of cooked fish by isoelectric focusing. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 25, 224-227.
- POLLARD, T.D. y COOPER, J.A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. **Annual Review of Biochemistry** 55, 987-1035.

- PRODÖHL, P.A., TAGGART, J.B. y FERGUSON, A. (1992). Genetic variability within and among sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations, multi-locus DNA fingerprint analysis. **Hereditas** 117, 45-50.
- PRODÖHL, P.A., WALKER, A.F., HYNES, R., TAGGART, J.B. y FERGUSON, A. (1997). Genetically monomorphic brown trout (*Salmo trutta* L.) populations, as revealed by mitochondrial DNA, multilocus and single-locus minisatellite (VNTR) analysis. **Heredity** 79, 208-213.
- PROUDFOOT, N. (1980). Pseudogenes. **Nature** 286, 840-841.
- QIU-QIONG, C. y TOUITOU, I. (1993). Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. **Nucleic Acids Research** 21, 3909-3910.
- QU, L-H., NICOLOSO, M. y BACHELLERIE, J-P. (1988). Phylogenetic calibration of the 5' terminal domain of large rRNA achieved by determining twenty eucariotic sequences. **Journal of Molecular Evolution** 28, 113-124.
- QUINTEIRO, J., SOTELO, C.G., REHBEIN, H., PRYDE, S.E., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R.I., REY-MÉNDEZ, M. y MACKIE, I.M. (1998). Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46, 1662-1669.
- RAM, J.L., RAM, M.L. y BAIDOUN, F.F. (1996). Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 44, 2460-2467.
- RAMSER, J., LÓPEZ-PERALTA, C., WETZEL, R., WEISING, K. y KAHL, G. (1996). Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. **Genome** 39, 17-25.
- RAWSON, P.D. y HILBISH, T.J. (1995). Distribution of male and female mtDNA lineages in populations of blue mussels, *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*, along the Pacific coast of North America. **Marine Biology** 124, 245-250.

- RAWSON, P.D., JOYNER, K.L., MEETZE, K. y HILBISH, T.J. (1996). Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. **Heredity** 77, 599-607.
- RAWSON, P.D. y HILBISH, T.J. (1998). Asymmetric introgression of mitochondrial DNA among European populations of blue mussels (*Mytilus* spp.). **Evolution** 52, 100-108.
- REA, S., CHIKUNI, K. y AVELLINI, P. (1996). Possibility of using single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis for discriminating European pig and wild boar meta samples. **Italian Journal of Food Science** 3, 211-220.
- REAL DECRETO 331/1999, de 26 de febrero, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de *Normalización y tipificación de los productos de la pesca, frescos, refrigerados o cocidos*. **Boletín Oficial del Estado** de 18 de marzo de 1999.
- REAL DECRETO 571/1999, de 9 de abril, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se aprueba la *Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos*. **Boletín Oficial del Estado** de 10 de abril de 1999.
- REAL DECRETO 1334/1999, de 31 de julio, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se aprueba la *Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios*. **Boletín Oficial del Estado** de 24 de agosto de 1999.
- REED, K.M. y PHILLIPS, R.B. (2000). Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Chromosome Research** 8, 5-16.
- REED, K.M., HACKETT, J.D. y PHILLIPS, R.B. (2000). Comparative analysis of intra-individual and inter-species DNA sequence variation in salmonid ribosomal DNA cistrons. **Gene** 249, 115-125.
- REGLAMENTO 104/2000/CE del Consejo, de 17 de diciembre de 2000, por el que se establece la Organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L17, de 21 de enero de 2000.

- REHBEIN, H. (1990). Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** 191, 1-10.
- REHBEIN, H. (1992). Parvalbumins as marker proteins for the fish species in fishery products. En: *Quality Assurance in the Fish Industry*. Huss, H.H., Jakobsen, M. y Liston, J. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, Holanda, 399-405.
- REHBEIN, H., ETIENNE, M., JÉRÔME, M., HATTULA, T., KNUDSEN, L.B., JESSEN, F., LUTEN, J.B., BOUQUET, W., MACKIE, I.M., RITCHIE, A.H., MARTÍN, R. y MENDES, R. (1995a). Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. **Food Chemistry** 52, 193-197.
- REHBEIN, H., MACKIE, I.M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., PERÉZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J. y REY-MÉNDEZ, M. (1995b). Fish species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). **Informationen für die Fischwirtschaft** 42, 209-212.
- REHBEIN, H., KRESS, G. y SCHMIDT, T. (1997a). Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 74, 35-41.
- REHBEIN, H., MACKIE, I.M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., PÉREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J. y REY-MÉNDEZ, M. (1997b). Comparison of different methods to produce single-strand DNA for identification of canned tuna by single-strand conformation polymorphism analysis. **Electrophoresis** 19, 1381-1384.
- REHBEIN, H., KÜNDIGER, R., MALMHEDEN YMAN, I., FERM, M., ETIENNE, M., JÉRÔME, M., CRAIG, A., MACKIE, I.M., JESSEN, F., MARTÍNEZ, I., MENDES, R., SMELT, A., LUTEN, J., PIÑEIRO, C. y PERÉZ-MARTÍN, R. (1999a). Species identification of cooked fish by urea isoelectric focusing and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. A collaborative study. **Food Chemistry** 67, 333-339.
- REHBEIN, H., MACKIE, I.M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PERÉZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J. y REY-MÉNDEZ, M. (1999b). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study

- and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. **Food Chemistry** 64, 263-268.
- REHBEIN, H., GONZALES-SOTELO, C., PEREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J., REY-MENDEZ, M., PRYDE, S., MACKIE, I.M. y SANTOS, T. (1999c). Differentiation of sturgeon caviar by single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **Archiv für Lebensmittelhygiene** 50, 1-24.
- REHBEIN, H., KÜNDIGER, R., PIÑEIRO, C. y PEREZ-MARTÍN, R.I. (2000). Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing. **Electrophoresis**, 21, 1458-1463.
- REITHINGER, R., LAMBSON, B.E., BARKER, D.C. y DAVIES, C.R. (2000). Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology** 38, 748-751.
- RICE, E.L., RODDICK, D. y SINGH, R.K. (1993). A comparison of molluscan (Bivalvia) phylogenies based on palaeontological and molecular data. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 2, 137-146.
- RITTENBURG, J.H. (1990). Fundamentals of immunoassay. En: *Development and Application of Immunoassays for Food Analysis*. Rittenburg, J.H. (ed.), Elsevier Applied Science, London-New York, 29-57.
- RITTENBURG, J.H. y GROTHAUS, G.D. (1992). Immunoassays: formats and applications. En: *Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay systems*. Morgan, M.R.A., Smith, C.J. y Williams, P.A. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K., 3-10.
- ROBIN, Y., BENYAMIN, Y. y VAN THOAI, V. (1976). Existence of homologous antigenic structures in unfolded creatine kinase and arginine kinase. **FEBS Letters** 63, 174.
- ROLLAND, M.P., BITRI, L. y BESAÇON, P. (1993). Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α_{s1} -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. **Journal of Dairy Research** 60, 413-420.

- ROSS, C., HEVENER, S., CLARK, R., HARTMANN, J.X. y MARI, F. (1998). Isolation of parvoalbumin isotypes by preparative HPLC techniques. **Preparative Biochemistry and Biotechnology** 28, 49-60.
- ROSSEN, L., NØRSKOV, P., HOLMSTRØM, K. y RASMUSSEN, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology** 17, 37-45.
- ROSSI, E.A., SHEPARD, S.R., POYER, J.C. y HARTMANN, J.X. (1992). Monoclonal antibodies specific to sailfish serum albumin: development of an assay for the identification of fish species in the field. **Hybridoma** 11, 333-338.
- RUBIN, G.M., YANDELL, M.D., WORTMAN, J.R., MIKLOS, G.L.G. y NELSON, C.R. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. **Science** 287, 2204-2215.
- RUIZ-LARA, S., PRATS, E., SAINZ, J. y CORNUDELLA, L. (1992). Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA from the mollusc *Mytilus edulis*. **Gene** 117, 237-242.
- RUMBAK, E., REID, D.G. y THOMAS, R.H. (1994). Reconstruction of phylogeny of 11 species of *Littorina* (Gastropoda: Littorinidae) using mitochondrial DNA sequence data. **Nautilus** 2, 91-97.
- RUSSELL, V.J., HOLD, G.L., PRYDE, S.E., REHBEIN, H., QUINTEIRO, J., REY-MENDEZ, M., SOTELO, C.G., PÉREZ-MARTÍN, R.I., SANTOS, A.T. y ROSA, C. (2000). Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48, 2184-2188.
- RUZZANTE, D.E., TAGGART, C.T., COOK, D. y GODDARD, S.V. (1997). Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) of Newfoundland, a test and evidence of temporal stability. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 2700-2708.
- RZEPECKI, L.M. y WAITE, J.H. (1993). The byssus of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* I: morphology and in situ protein processing during maturation. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 2, 255-266.
- SAAVEDRA, C., STEWART, D.T., STANWOOD, R.R. y ZOURUS, E. (1996). Species-specific segregation of gender-associated mitochondrial DNA types in

an area where two mussel species (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) hybridize. **Genetics** 143, 1359-1367.

SAAVEDRA, C., REYERO, M. y ZOURUS, E. (1997). Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Genetics** 145, 1073-1082.

SAIKI, R.K., SCARF, S. y FALOONE, F. (1985). Enzyme amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. **Science** 230, 1350-1353.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. y ERLICH, H.A. (1988). Primed-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239, 487-491.

SAIKI, R.K. (1989). The design and optimization of the polymerase chain reaction. En: *PCR Technology*. Erlich, H.A. (ed.), Stockton Press, New York, EE.UU., 7-22.

SAINZ, J. y CORNUDELLA, L. (1990). Preservation of a complex satellite DNA in two species of echinoderms. **Nucleic Acids Research** 18, 885-890.

SAITOU, N. y NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4, 406-425.

SAJDAK, S.L. y PHILLIPS, R.B. (1997). Phylogenetic relationships among *Coregonus* species inferred from the DNA sequence of the first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54, 1494-1503.

SAJDAK, S.L., REED, K.M. y PHILLIPS, R.B. (1998). Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **Journal of Molecular Evolution** 46, 680-688.

SAMARAJEewa, U., WEI, C.I., HUANG, T.S. y MARSHALL, M.R. (1991). Application of immunoassay in the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 29, 403-434.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed.), New York, EE.UU.
- SANJUAN, A., COMESAÑA, A.S. y DE CARLOS, A. (1996). Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the S. W. European *Mytilus galloprovincialis* Lmk. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 198, 89-100.
- SCHEIDER, M., MANDORF, T. y RUBACH, K. (1997). Reliable method for differentiation and identification of palatable fish species using DNA analysis and RAPD techniques. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau** 93, 137-140.
- SCHEU, P., GASCH, A. y BERGHOF, K. (1999). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. **Letters in Applied Microbiology** 29, 416-420.
- SCHILL, W.B. y DORAZIO, R.M. (1990). Immunological discrimination of Atlantic striped bass stocks. **Transactions of the American Fisheries Society** 119, 77-85.
- SCHWARTZ, R.J. y ROTHBLUM, K. (1980). Regulation of muscle differentiation: isolation and purification of chick actin messenger ribonucleic acid and quantitation with complementary deoxyribonucleic acid probes. **Biochemistry** 19, 2506-2514.
- SECCHI, C., SONCINI, G., BERRINI, A., RUSSO, V. y BIONDI, P.A. (1982). Reliable mollusc intragenera and intraspecies identification by polyacrylamide gel isoelectric focusing. **Archivio Veterinario Italiano** 33, 99-105.
- SHANTI, K.N., MARTÍN, B.M., NAGPAL, S., METCALFE, D.D. y SUBBA RAO, P.V. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. **Journal of Immunology** 151, 5354-5363.
- SHEPARD, S. y HARTMANN, J. (1996). Immunologic identification of billfish carcasses. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 5, 215-219.
- SHIOMI, K., HAYASHI, S., OSHIKAWA, M. y SHIMAKURA, K. (1998). Identification of parvalbumin as an allergen in horse mackerel muscle. **Fisheries Science** 64, 300-304.

- SILBERMAN, J.D. y WALSH, P.J. (1992). Species identification of spiny lobster phyllosome larvae *via* ribosomal DNA analysis. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 1, 195-205.
- SKERRITT, J.H. y HILL, A.S. (1991). Self-management of dietary compliance in celiac disease by means ELISA "home test" to detect gluten. **The Lancet** 337, 379-382.
- SKIBINSKI, D.O.F. (1994). DNA technology and genetics of aquatic invertebrates. En: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Beaumont, A.R. (ed.), Chapman & Hall, London, U.K., 177-199.
- SLADE, R.W., MORITZ, C., HEIDEMAN, A. y HALE, P.T. (1993). Rapid assessment of single copy nuclear DNA variation in diverse species. **Molecular Ecology** 2, 359-373.
- SLATER, G.W., MAYER, P. y DROUIN, G. (1996). Migration of DNA through gels. **Methods in Enzymology** 270, 272-295.
- SLATTERY, W.W. y SINCLAIR, A.J. (1983). Differentiation of meat according to species by the electrophoretic separation of muscle lactate dehydrogenase and sterase isoenzymes and isoelectric focusing of soluble muscle proteins. **Australian Veterinary Journal** 60, 47-51.
- SMITH, D.M. (1995). Immunoassays in process control and speciation of meats. **Food Technology** 49, 120-128.
- SNYDER, M., FRASER, A.R., LA ROCHE, J., GARTNER-KEPKAY, K.E. y ZOURUS, E. (1987). Atypical mitochondrial DNA from the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 84, 7595-7599.
- SOTELO, C.G., PIÑEIRO, C., GALLARDO, J.M. y PERÉZ-MARTÍN, R.I. (1993). Fish species identification in seafood products. **Trends in Food Science and Technology** 4, 395-401.
- SPIEGELHALTER, F., LAUTER, F.-R. y RUSSELL, J.M. (2001). Detection of genetically modified food products in a commercial laboratory. **Journal of Food Science** 66, 634-640.

- SPINARDI, L., MAZARS, R. y THEILLET, C. (1991). Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. **Nucleic Acids Research** 19, 4009.
- SPITZ, M., SPITZ, R., THORPE, R. y EUGUI, E. (1984). Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods** 70, 39-43.
- SRITHARAN, V. y BARKER, R.H. (1991). A simple method for diagnosing M. tuberculosis infection in clinical samples using PCR. **Molecular and Cellular Probes** 5, 385-395.
- STEINER, G. y MÜLLER, M. (1996). What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny?. **Journal of Molecular Evolution** 43, 58-70.
- STEVENS, T.A., WITHLER, R.E., GOH, S.H. y BEACHAM, T.D. (1993). A new multilocus probe for DNA fingerprinting in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), and comparison with a single-locus probe. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 50, 1559-1567.
- STOREY, K.B. (1977). Purification and characterization of arginine kinase from the mantle muscle of the squid, *Symplectoteuthis oualaniensis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 179, 518-526.
- SUN, Y.L., WAN, K.P. y SUZUKI, H. (1999). Analyses of glycolipids from fish, shellfish, and sea snake lipids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 960-963.
- SUZUKI, T. y FURUKOHRI, T. (1994). Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycoamine kinase and arginine kinase from invertebrates. **Journal of Molecular Biology** 237, 353-357.
- SUZUKI, T., KAWASAKI, Y. y FURUKOHRI, T. (1997a). Evolution of phosphagen kinase IV. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of two-domain arginine-kinase from the sea anemone *Anthopleura japonicus*. **Biochemical Journal** 328, 301-306.
- SUZUKI, T., BAN, T. y FURUKOHRI, T. (1997b). Evolution of phosphagen kinase V. cDNA-derived amino acid sequences of two molluscan arginine kinases from the chiton *Liolophura japonica* and the turbanshell *Battillus cornutus*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1340, 1-6.

- SUZUKI, T., KAWASAKI, Y., UNEMI, Y., NISHIMURA, Y., SOGA, T., KAMIDOCHI, M., YAZAWA, Y. y FURUKOHRI, T. (1998). Gene duplication and fusion have occurred frequently in the evolution of phosphagen kinases: a two-domain arginine kinase from the clam *Pseudocardium sachalinensis*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1388, 253-259.
- SUZUKI, T., KAMIDOCHI, M., INOUE, N., KAWAMICHI, H., YAZAWA, Y., FURUKOHRI, T. y ELINGTON, R. (1999). Arginine kinase evolved twice: evidence that equinoderm arginine kinase originated from creatine kinase. **Biochemical Journal** 340, 671-675.
- SWEIJ, D., N.A., BOWIE, R.C.K., EVANS, B.S. y LOPATA, A.L. (2000). Molecular genetics and the management and conservation of marine organisms. **Hydrobiologia** 420, 153-164.
- SWOFFORD, D.L. (1993). PAUP: phylogenetic analysis using parsimony. Version 3.1. Programa distribuido por Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, EE.UU.
- TAGGART, J.B. y FERGUSON, A. (1990). Hypervariable minisatellite DNA single locus probes for the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Biology** 37, 991-993.
- TAGLIAVINI, J., HARRISON, I.J. y GANDOLFI, G. (1995). Discrimination between *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* by polymerase chain reaction reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Fish Biology** 47, 741-743.
- TAJIMA, F. y NEI, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. **Molecular Biology and Evolution** 1, 269-285.
- TAYLOR, A., ERBA, H.P., MUSCAT, G.E.O. y KEDES, L. (1988). Nucleotide sequence and expression of the human skeletal α -actin gene: Evolution of functional regulatory domains. **Genomics** 3, 323-336.
- TAYLOR, W.J. y JONES, J.L. (1992a). An immunoassay for distinguishing between crustacean tail meat and white fish. **Food and Agricultural Immunology** 4, 177-180.

- TAYLOR, W.J. y JONES, J.L. (1992b). An immunoassay for verifying the identity of canned sardines. **Food and Agricultural Immunology** 4, 169-175.
- TAYLOR, W.J., PATEL, N.P. y JONES, J.L. (1994a). Antibody-based methods for assessing seafood authenticity. **Food and Agricultural Immunology** 6, 305-314.
- TAYLOR, E.B., BEACHAM, T.D. y KAERIYAMA, M. (1994b). Population structure and identification of North Pacific Ocean chum salmon (*Oncorhynchus keta*) revealed by an analysis of minisatellite DNA variation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 51, 1430-1442.
- TENOVER, F.C. (1988). Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. **Clinical Microbiological Reviews** 1, 82-101.
- TERRETT, J.A., MILES, J. y THOMAS, R.H. (1996). Complete DNA sequence of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Stylommatophora). **Journal of Molecular Evolution** 42, 160-168.
- THOMAS, W.K. y BECKENBACH, A.T. (1989). Variation in salmonid mitochondrial DNA: evolutionary constraints and mechanisms of substitution. **Journal of Molecular Evolution** 24, 218-227.
- THOMAS, K.W. y KOCHER, T.D. (1993). Sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNAs. **Methods in Enzymology** 224, 391-399.
- TOPAL, M.D., THRESHER, R.J., CONRAD, M. y GRIFFITH, J. (1991). *Nae I* endonuclease binding to pBR322 DNA induces looping. **Biochemistry** 30, 2006-2010.
- TORO, J.E. (1998). PCR-based nuclear and mtDNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). **Aquatic Living Resources** 11, 347-353.
- TORRES, R.A., GANAL, M. y HEMLEBEN, V. (1990). GC balance in the internal spacers ITS-1 and ITS-2 of nuclear ribosomal RNA genes. **Journal of Molecular Evolution** 30, 170-181.
- TRINGALI, M.D., BERT, T.M. y SEYOUM, S. (1999). Genetic identification of centropomine fishes. **Transactions of the American Fisheries Society** 128, 446-458.

- TYSSEN, P. (1985). Enzymes used in activity amplification assays. En: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Burdon, R.H. y Van Knippenberg, P.H. (Ed.). Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K., 174-204.
- UGOZZOLI, L. y WALLACE, R.B. (1991). Allele-specific polymerase chain reaction. **Methods: A companion to Methods in Enzymology** 2, 42-48.
- UNSELD, M., BEYERMANN, B., BRANDT, P. y HIESEL, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. **PCR Methods and Applications** 4, 241-243.
- VALERO, M.C., DE LUIS, O., CRUCES, J. y JURADO, L.A.P. (2000). Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region on mouse chromosome 5G: The low-copy repeats that flank the Williams-Beuren syndrome deletion arose at breakpoint sites of an evolutionary inversion. **Genomics** 69, 1-13.
- VAN BELKUM, A., HERMNAS, P.W.M., LICCIARDELLO, L., STEFANI, S., GRUBB, W., VAN LEEUWEN, W. y GOESSENS, W.H.F. (1998). Polymerase chain reaction mediated typing of microorganisms tracking dissemination of genes and genomes. **Electrophoresis** 19, 602-607.
- VAN BENEDEN, R., WALTER, C.W. y LAUGHNER, E.S. (1997). Characterization of gene expression of a *p53* homologue in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 6, 116-122.
- VANDEKERCKHOVE, J. y WEBER, K. (1979). The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. **Differentiation** 14, 123-133.
- VANDEKERCKHOVE, J. y WEBER, K. (1984). Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins: the evolution of the different vertebrate muscle actins. **Journal of Molecular Biology** 179, 391-413.
- VAN DE PEER, Y. y DE WACHTER, R. (1993). TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. **Computer Applications in the Bioscience** 9, 177-182.

- VAN OPPER, M.J.H., DRAISMA, S.G.A., OLSEN, J.L. y STAM, W.T. (1995). Multiple trans-Artic passages in the red alga *Phycodrys rubens*: evidence from nuclear rDNA ITS sequences. **Marine Biology** 123, 179-188.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., BRIAND, J.P., MULLER, S. y PLAUE, S. (1988). Molecular dissection of protein antigens and the prediction of epitopes. En: *Synthetic Polypeptides as Antigens*. Burdon, R.H. y Van Knippenberg, P.H. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, Holanda, vol. 19, 1-39.
- VASAK, M., NAGAYAMA, K., WUTHRICH, K., MERTENS, M.L. y KAGI, J.H.R. (1979). Nuclear magnetic resonance and fluorescence studies of creatine kinase: spectroscopic evidence for aromatic residue near the ADP binding site. **Biochemistry** 18, 5050-5055.
- VENKATESH, B. y BRENNER, S. (1997). Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene, a comparative analysis of teleost growth hormone gene. **Gene** 187, 211-215.
- VERREZ, V., BENYAMIN, C. y ROUSTAN, C. (1992). Detection of marine invertebrates in surimi-based products. En: *Quality Assurance in the Fish Industry*. Huss, H.H. (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K., 441-448.
- VERREZ-BAGNIS, V. y ESCRICHE-ROBERTO, I. (1993). The performance of ELISA and dot-blot methods for the detection of crab flesh in heated and sterilized surimi-based products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 63, 445-449.
- VIALA, B., ROBIN, Y. y VAN THOAI, N. (1970). Comparaison immunochimique de quelques phosphogène kinases de muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology** 32, 401-410.
- VISSEL, B. y CHOO, K.H. (1988). Altered activity of restriction endonuclease *Mnl* I cleavage of mouse satellite DNA. **Nucleic Acids Research** 16, 4731.
- VOLLER, A., BIDWELL, D. y BARTLETT, A. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose, N.R., Friedman, H. y Fahey, J.L. (Ed.), American Society for Microbiology, Washington D.C., EE.UU., 99-109.

- WATABE, S., SRI KANTHA, S., HASHIMOTO, K. y KAGAWA, H. (1988). Immunological species-specificity of paramyosin in association with its phosphorylation. **Journal of Muscle Research and Cell Motility** 9, 282.
- WATABE, S., SRI KANTHA, S., HASHIMOTO, K. y KAGAWA, H. (1990). Phosphorylation and immunological cross-reactivity of paramyosin: a comparative study. **Comparative Biochemistry and Physiology** 96B, 81.
- WATABE, S., HIRAYAMA, Y., IMAI, J., KIKUCHI, K. y YAMASHITA, M. (1995). Sequences of cDNA clones encoding α -actin of carp and goldfish skeletal muscles. **Fisheries Science** 61, 998-1003.
- WATSON, J.D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J. y ZOLLER, M. (1992). The polymerase chain reaction. En: *Recombinant DNA*, 2ª ed. Scientific American Books (ed.), EE.UU., 79-95.
- WATTERS, J.W. y DIETRICH, W.F. (2001). Genetic, physical, and transcript map of the Itxs 1 region of mouse chromosome. **Genomics** 73, 223-231.
- WÄTZIG, H. y DETTE, C. (1994). Capillary electrophoresis (CE) – a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences. **Pharmazie** 49, 83-96.
- WEBER, K. y KABSCH, W. (1994). Intron positions in actin genes seem unrelated to the secondary structure of the protein. **The EMBO Journal** 13, 1280-1286.
- WELSH, J. y McCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** 18, 7213-7218.
- WEST, B.L., BABBITT, P.C., MENDEZ, B. y BAXTER, J.D. (1984). Creatine kinase protein sequence encoded by a cDNA made from *Torpedo californica* electric organ mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 81, 7007-7011.
- WEYANT, R.S., EDMUNDS, P. y SWAMINATHAN, B. (1990). Effect of ionic and nonionic detergents by the *Taq* polymerase. **Biotechniques** 9, 308-309.
- WIGGIN, K. y KRZYNOWEK, J. (1983). Identification of frozen, cooked shellfish species by agarose isoelectric focusing. **Journal of Association of Official Analytical Chemists** 66, 118-122.

- WILDING, C.S., BEAUMONT, A.R. y LATCHFORD, J.W. (1997). Mitochondrial DNA variation in the scallop *Pecten maximus* (L.) assessed by a PCR-RFLP method. **Heredity** 79, 178-189.
- WILDING, C.S., MILL, P.J. y GRAHAME, J. (1999). Partial sequence of the mitochondrial genome of *Littorina saxatilis*: relevance to gastropod phylogenetics. **Journal of Molecular Evolution** 48, 348-359.
- WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology** 63: 3741-3751.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. y TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18, 6531-6535.
- WIMBERGER, P., BURR, J., GRAY, A., LÓPEZ, A. y BENTZEN, P. (1999). Isolation and characterization of twelve microsatellite loci for rockfish (*Sebastes*). **Marine Biotechnology** 1, 311-315.
- WINTERØ, A.K., THOMSEN, P.D. y DAVIS, W. (1990). A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. **Meat Science** 27, 75-85.
- WOLCOTT, M.J. (1991). DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. **Journal of Food Protection** 54, 387-407.
- WOLF, C., RENTSCH, J. y HÜBNER, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1350-1355.
- WRIGHT, J.M. (1993). DNA fingerprinting of fishes. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 2: Molecular Biology Frontiers*. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Ed.), Elsevier Science Ltd., Philadelphia, EE.UU., 57-91.
- WRIGHT, J.M. y BENTZEN, P. (1994). Microsatellites: genetic markers for the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 4, 384-388.
- WU, D.Y., UGOZZOLI, L., PAL, B.K. y WALLACE, R.B. (1989). Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 86, 2757-2760.

- WYSS, M., SMEITINK, J., WEVERS, R.A. y WALLIMANN, T. (1992). Mitochondrial creatine kinase substrates modulate mitochondrial permeability transition and neuronal cell death. **Biochimica et Biophysica Acta** 1102, 119-166.
- YAMAZAKI, N., UESHIMA, J.A. y TERRETT, J.A. (1997). Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. **Genetics** 145, 749-758.
- YOWELL, K. y FLURKEY, W. (1986). Effect of freezing and microwave heating on proteins from codfish fillets: Analysis by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Food Science** 51, 508.
- ZAKUT, R., SHANI, M., GIVOL, D., NEUMAN, S., YAFFE, D. y NUDEL, U. (1982). Nucleotic sequence of the rat skeletal muscle actin gene. **Nature** 298, 857-859.
- ZHANG, H., MIKAWA, N., YAMADA, Y., HORIE, N., OKAMURA, A., UTOH, T., TANAKA, S. y MOTONOBU, T. (1999). Foreign eel species in the natural waters of Japan detected by polymerase chain reaction of mitochondrial cytochrome b region. **Fisheries Science** 65, 684-686.
- ZHUO, L., SAJDAK, S.L. y PHILLIPS, R.B. (1994). Minimal intraspecific variation in the sequence of the transcribed spacer regions of the ribosomal DNA of lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Genome** 37, 664-671.
- ZOURUS, E., KENNETH, R.F., OBERHAUSER BALL, A. y POGSON, G.H. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. **Nature** 359, 412-413.

Capítulo IX

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de la almeja fina, italiana, babosa y rubia	11
Figura 2. <i>Ruditapes decussatus</i> (almeja fina)	15
Figura 3. <i>Venerupis pullastra</i> (almeja babosa)	16
Figura 4. Características de los sifones de almeja italiana, babosa y fina	16
Figura 5. <i>Ruditapes philippinarum</i> (almeja italiana)	17
Figura 6. <i>Venerupis rhomboides</i> (almeja rubia)	18
Figura 7. Distribución por países de las capturas mundiales de almeja fina, italiana y babosa	28
Figura 8. Consumo alimentario en el hogar	36
Figura 9. Técnica de electroforesis en gel	43
Figura 10. Perfil electroforético obtenido mediante SDS-PAGE del músculo aductor de tres especies de moluscos	48
Figura 11. Técnica de Isoelectroenfoque	49
Figura 12. Perfil electroforético de la almeja fina obtenido a partir de músculo aductor, pie y manto mediante las técnicas de isoelectroenfoque (IEF) y SDS-PAGE	53
Figura 13. Perfiles electroforéticos obtenidos mediante la técnica de isoelectroenfoque a partir de almeja fina, berberecho y almeja de Vietnam	53
Figura 14. Perfiles electroforéticos de las proteínas solubles del músculo aductor, obtenidos mediante la técnica de urea-isoelectroenfoque a partir de almeja de Vietnam, almeja fina y berberecho	54
Figura 15. Técnica de inmunodifusión en geles de agar	60
Figura 16. Técnica de inmunoelectroforesis	62
Figura 17. Técnica de ELISA indirecto	65
Figura 18. Técnica de <i>Immunodotting</i>	66
Figura 19. ADN mitocondrial del molusco <i>Mytilus edulis</i>	73
Figura 20. Esquema de la técnica de hibridación de ADN <i>dot blot</i>	78

Figura 21. Esquema del punto de corte de las enzimas de restricción <i>Hae</i> III y <i>Eco</i> RI, que producen bordes romos y cohesivos respectivamente	80
Figura 22. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	82
Figura 23. Esquema del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones del ADN amplificadas por PCR (PCR-RFLP)	91
Figura 24. Esquema de la técnica de PCR-RAPD	97
Figura 25. Técnica de <i>multilocus minisatellite DNA fingerprinting</i>	103
Figura 26. Amplificación de un microsatélite mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	105
Figura 27. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación genética de almeja fina, italiana, babosa y rubia	114
Figura 28. Estructura del ADN ribosómico	117
Figura 29. Método de extracción de ADN de Bagshaw (1991)	125
Figura 30. Método de extracción <i>Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food</i> (Promega)	127
Figura 31. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación genética a partir de ARN de almeja fina, italiana, babosa y rubia	129
Figura 32. Síntesis de la primera cadena de ADNc empleando el cebador oligo-dT y la enzima transcriptasa inversa	135
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de los fragmentos de ADN	144
Figura 34. Purificación de productos de PCR utilizando el kit de purificación <i>Qiaquick gel extraction</i> (Qiagen)	145
Figura 35. Estructura del vector circular pGEM [®] -T Easy	147
Figura 36. Esquema de las etapas de la técnica de PCR-RFLP	155
Figura 37. Esquema de los pasos a seguir utilizando el sistema automatizado Phastsystem [™]	158

Figura 38. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación de almeja babosa, fina, italiana y rubia, mediante técnicas inmunológicas	160
Figura 39. Preparación de los extractos antigénicos	162
Figura 40. Obtención de los inmunosueros	167
Figura 41. Técnica de ELISA indirecto en paletas	174
Figura 42. Protocolo de obtención de anticuerpos monoclonales	176
Figura 43. Mecanismos de selección de las células resultantes de la fusión entre linfocitos y las células de mieloma de ratón ..	180
Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa de ADN de almeja babosa, fina, italiana y rubia, obtenido empleando el método de DeSalle y col. (1993)	190
Figura 45. Análisis electroforético del ADN obtenido por el método de Borgo y col. (1996)	190
Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa utilizando el método de Jones y col. (1993)	191
Figura 47. Electroforesis en agarosa de los ADNs obtenidos utilizando el método de Patwary y col. (1996)	192
Figura 48. Análisis electroforético de los ADNs obtenidos con el método <i>QIAamp tissue kit</i>	192
Figura 49. Electroforesis en gel de agarosa de ADN obtenido utilizando el método de Bagshaw (1991)	193
Figura 50. Análisis electroforético de los ADNs obtenidos empleando el kit <i>Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food</i>	194
Figura 51. Análisis electroforético de los ARNs obtenidos según el método <i>ULTRASPEC™ RNA Isolation System</i>	195
Figura 52. Electroforesis en agarosa utilizando el método de extracción de ARN <i>RNeasy Mini Kit</i>	195
Figura 53. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen nuclear α -actina, obtenidos a partir de muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia	197

Figura 54. Secuencias de ADN correspondientes al fragmento del gen α -actina amplificado con los cebadores act-2/act-4, a partir de muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia, alineadas con la secuencia del ADNc de vieira	198
Figura 55. Mapa de restricción de la secuencia de un fragmento del gen α -actina de la almeja babosa (<i>V. pullastra</i>)	201
Figura 56. Mapa de restricción de la secuencia de un fragmento del gen α -actina de la almeja fina (<i>R. decussatus</i>)	203
Figura 57. Mapa de restricción de la secuencia de un fragmento del gen α -actina de la almeja italiana (<i>R. philippinarum</i>)	205
Figura 58. Mapa de restricción de la secuencia de un fragmento del gen α -actina de la almeja rubia (<i>V. rhomboides</i>)	207
Figura 59. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores act-2 y act-4 a partir de almeja babosa, fina, italiana y rubia	209
Figura 60. Electroforesis en agarosa del producto de PCR purificado del gen α -actina amplificado con los oligonucleótidos act-5 y act-6, obtenidos a partir de las cuatro especies de almejas	211
Figura 61. Perfiles de bandas de ADNmc obtenidos mediante la técnica de PCR-SSCP en PhastSystem™ a partir de productos de PCR del gen α -actina, amplificados con los cebadores act-5 y act-6	212
Figura 62. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS-1 e ITS-2	213
Figura 63. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ITS-1/ITS-2 ..	215
Figura 64. Mapa de restricción correspondiente a los productos de PCR de almeja babosa (<i>V. pullastra</i>), obtenidos tras la amplificación con los cebadores ITS-1/ITS-2	219
Figura 65. Mapa de restricción correspondiente a los productos de PCR de almeja fina (<i>R. decussatus</i>), obtenidos tras la amplificación con los cebadores ITS-1/ITS-2	224
Figura 66. Mapa de restricción correspondiente a los productos de PCR de almeja italiana (<i>R. philippinarum</i>), obtenidos tras la amplificación con los cebadores ITS-1/ITS-2	230

Figura 67. Perfil de restricción de los productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS-1/ITS-2 a partir de almeja babosa, fina e italiana	236
Figura 68. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 16S ARNr amplificados con los cebadores 16SAR y 16SBR	238
Figura 69. Registro gráfico y secuencia nucleotídica de un producto de PCR del gen 16S ARNr de almeja italiana, utilizando el oligonucleótido 16SAR como cebador en la reacción de secuenciación	240
Figura 70. Registro gráfico y secuencia nucleotídica de un producto de PCR del gen 16S ARNr de almeja italiana, utilizando el oligonucleótido 16SBR como cebador en la reacción de secuenciación	241
Figura 71. Secuencias de ADN obtenidas a partir de los productos de PCR del gen 16S ARNr de las cuatro especies de almejas, alineadas con la secuencia de la especie de mejillón <i>Mytilus edulis</i>	242
Figura 72. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja babosa amplificado con los cebadores 16SAR y 16SBR	244
Figura 73. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja fina amplificado con los cebadores 16SAR y 16SBR	246
Figura 74. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja italiana amplificado con los cebadores 16SAR y 16SBR	248
Figura 75. Mapa de restricción correspondiente al fragmento del gen 16S ARNr de almeja rubia amplificado con los cebadores 16SAR y 16SBR	250
Figura 76. Perfiles de restricción de los productos de PCR del gen 16S ARNr obtenidos de muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia	253
Figura 77. Secuencias nucleotídicas correspondientes a un fragmento del ADNc de la enzima arginina quinasa, obtenidas a partir de muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia	255
Figura 78. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen arginina quinasa amplificados con los cebadores oligo-dT-adaptor y AKalm	257

- Figura 79.** Secuencias aminoacídicas de un fragmento de la enzima arginina quinasa, deducidas a partir del ADNc de almeja babosa, fina, italiana y rubia 259
- Figura 80.** Resultados del ELISA en paletas para la identificación de muestras de almeja babosa, fina y rubia 266

Capítulo X

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Capturas mundiales de pescados, moluscos y crustáceos, por países productores	20
Tabla 2. Capturas pesqueras de los países de la Unión Europea	21
Tabla 3. Capturas mundiales de pescados, moluscos y crustáceos, por especies	22
Tabla 4. Producción de moluscos frescos	23
Tabla 5. Producción de almejas, berberechos y arcas	23
Tabla 6. Producción mundial y valor económico de peces, moluscos y crustáceos obtenidos mediante acuicultura en 1998	25
Tabla 7. Producción española de peces, moluscos y crustáceos procedentes de la acuicultura	26
Tabla 8. Capturas nominales de almeja fina	27
Tabla 9. Capturas nominales de almeja italiana	27
Tabla 10. Capturas nominales de almeja babosa	27
Tabla 11. Producción de acuicultura de almeja fina	29
Tabla 12. Producción de acuicultura de almeja italiana	29
Tabla 13. Producción de acuicultura de almeja babosa	29
Tabla 14. Comercio exterior español de pescados y productos de la pesca	33
Tabla 15. Comercio exterior español de almejas y otras especies de venéridos	34
Tabla 16. Comercialización de almejas en Mercamadrid	37
Tabla 17. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para la identificación de especies	70
Tabla 18. Pauta de inmunización de los conejos por inoculación de los extractos antigénicos de almeja babosa, fina, italiana y rubia	165
Tabla 19. Extracción de ADN a partir de muestras de almeja babosa, fina, italiana y rubia, empleando diversos métodos de extracción	189
Tabla 20. Porcentajes de homología entre los fragmentos de ADNc de arginina quinasa de distintas especies de almejas y otros moluscos	257

Tabla 21. Porcentajes de homología entre las secuencias aminoacídicas deducidas del ADNc de la arginina quinasa para las distintas especies de almejas, y las de otros moluscos	260
Tabla 22. Resultados del ELISA indirecto para el análisis de proteínas solubles de muestras de almejas, empleando los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR sin neutralizar	264
Tabla 23. Resultados del ELISA indirecto para el análisis de proteínas solubles de muestras de almejas, empleando los anticuerpos policlonales anti-PSB, anti-PSF, anti-PSI y anti-PSR neutralizados	265

Capítulo XI

GLOSARIO DE TÉRMINOS

A	Adenina
A_{230nm}	Absorbancia a 230 nm de longitud de onda
A_{260nm}	Absorbancia a 260 nm de longitud de onda
A_{280nm}	Absorbancia a 280 nm de longitud de onda
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina) sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN_{bc}	ADN bicatenario
ADN_c	ADN complementario
ADN_{mc}	ADN monocatenario
ADN_{mt}	ADN mitocondrial
ADN_n	ADN nuclear
ADN_r	ADN ribosómico
ADK	Adenilato quinasa
AK	Arginina quinasa
AMV-RT	Transcriptasa inversa aviar
Anti- PSB	Anticuerpos policlonales obtenidos frente a las PSB
Anti- PSF	Anticuerpos policlonales obtenidos frente a las PSF
Anti- PSI	Anticuerpos policlonales obtenidos frente a las PSI
Anti- PSR	Anticuerpos policlonales obtenidos frente a las PSR
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AP-PCR	<i>Arbitrary Primed PCR</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	ARN mensajero
ARN_r	ARN ribosómico
ARN_t	ARN de transferencia
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina

C	Citosina
CFS	Suero fetal bovino
CK	Creatina quinasa
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
EDTA	Ácido etilen-diamino tetraacético
EGTA	Etilenglicol-bis(2-aminoetil)-tetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EOF	Flujo electroosmótico
ETS	Espaciador externo de la transcripción
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i> Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación
FINS	Forensically Informative Nucleotide Sequencing
G	Guanina
GCG	<i>Genetic Computer Group</i>
GITC	Isotiocianato de guanidina
G-3-PD	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
HPLC	<i>High Performance Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HT	Hipoxantina-Timidina
IEF	Isoelectroenfoque
IGS	Región espaciadora intergénica
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopirano
ITS	Espaciador interno de la transcripción
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
M-MLV RT	Transcriptasa inversa de ratón
O-NPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranósido
P-NPP	Para-nitrofenil
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-RFLP	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR
PCR-SSCP	<i>PCR-Single Strand Conformational Polymorphism</i> Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN de regiones amplificadas por PCR
PEG	Polietilenglicol
PSB	Proteínas solubles de almeja babosa
PSF	Proteínas solubles de almeja fina
PSI	Proteínas solubles de almeja italiana
PSR	Proteínas solubles de almeja rubia
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> Polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RP-HPLC	<i>Reverse Phase HPLC</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i> Transcriptasa inversa-PCR
SEC	Cromatografía de exclusión
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SSCP	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i> Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN
T	Timina
T_a	Annealing Temperature Temperatura de hibridación
T_{amb}	Temperatura ambiente
T_m	Melting Temperature Temperatura de fusión
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
UV	Ultravioleta
V	Voltios
Vh	Voltios-hora
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa